



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE QUÍMICA ICUAP
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

TESIS

Análisis del nivel de ARNm de ATG4, ATG17 y ATG18a en células envejecidas de Schizosaccharomyces pombe. Generación de la construcción interruptora de los genes ATG4 y ATG17.

Presenta:

QFB. Patricia Leany Segundo Ibañez

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Químicas en el
área de Bioquímica y Biología Molecular**

Directora de tesis:

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta

Diciembre 2017

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Envejecimiento	9
2.2. Modelos de estudio del envejecimiento	10
2.3. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como modelo de estudio del envejecimiento	12
2.3.1. Características del envejecimiento cronológico	13
2.4. Autofagia	16
2.4.1. Tipos de autofagia	17
2.4.2. Maquinaria central de autofagia	18
2.4.3. Regulación del proceso de autofagia	29
3. MARCO DE REFERENCIA	32
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
5. JUSTIFICACIÓN	35
6. HIPÓTESIS	35
6.1. Hipótesis nula	37
7. OBJETIVOS	37
7.1. Objetivo general	37
7.2. Objetivos particulares	37
8. METODOLOGÍA	38
8.1. Determinación de los niveles de ARNm de los genes <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> y <i>ATG18a</i>	38
8.1.1. Cultivo y envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i>	37
8.1.2. Diseño de oligonucleótidos para qPCR	40
8.1.3. Purificación de ADN cromosómico de <i>S. pombe</i>	41
8.1.4. Purificación de ARN total de <i>S. pombe</i>	42
8.1.5. Reacción de PCR en punto final	43

8.1.6. Reacciones de qRT-PCR en tiempo real	44
8.6.1.1. Generación de curvas estándar de amplificación	44
8.6.1.2. qRT-PCR con cuantificación relativa a la curva estándar o cuantificación por el método de $\Delta\Delta C_t$	46
8.2 Construcción de plásmidos para interrupción por recombinación homóloga de los genes <i>ATG4</i> y <i>ATG17</i>	48
8.2.1. Diseño de oligonucleótidos para la generación del cassette de interrupción de los genes <i>ATG4</i> y <i>ATG17</i>	50
8.2.2. Amplificación por PCR de los fragmentos para la construcción del cassette de interrupción	52
8.2.2.1 Amplificación y reamplificación por PCR en punto final	52
8.2.2.2 Purificación de banda de PCR	52
8.2.3. Clonación de los fragmentos AB - <i>ATG4/ATG17</i> , CD - <i>ATG4/ATG17</i> y <i>URA4</i>	53
8.2.3.1 Reacción de ligación de los fragmentos AB- <i>ATG4/ATG17</i> , CD- <i>ATG4/ATG17</i> y <i>URA4</i> con el vector de clonación pJET1.2 blunt	53
8.2.3.2. Transformación de <i>E. coli</i> por el método de $CaCl_2$	54
8.2.3.3. Identificación de colonias positivas	55
8.2.3.4. Purificación de ADN plasmídico	56
8.2.4. Ligación de CD <i>ATG4/ATG17</i> + <i>URA4</i> y clonación en pJET1.2 blunt	57
8.2.4.1. Restricción enzimática de los plásmidos CD - <i>ATG4/ATG17</i> -pJET1.2 y <i>URA4</i> -pJET y ligación	57
8.2.5. Ligación de <i>URA</i> -CD <i>ATG4/ATG17</i> + AB <i>ATG4/ATG17</i> y clonación en pJET 1.2 blunt	59
8.2.6. Transformación de <i>S. pombe</i>	60
8.2.6.1. Identificación de colonias transformadas de <i>S. pombe</i> por PCR	62
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
9.1. Determinación de los niveles de ARNm de los genes <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> y <i>ATG18a</i>	65
9.1.1. Cultivo y envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i>	65
9.1.2. Diseño de oligonucleótidos para qPCR	67

9.1.3. Estandarización de condiciones de amplificación para los genes <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> , <i>SDH1</i> , <i>HPT1</i> y <i>ATG18a</i>	68
9.1.4. Cuantificación de los niveles de los transcritos de <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> y <i>ATG18a</i> en condiciones de envejecimiento cronológico	72
9.1.4.1. Niveles de los transcritos de <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> en la cepa <i>S. pombe</i> 972	72
9.1.4.2. Niveles de los transcritos de <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> y <i>ATG18a</i> en la cepa <i>S. pombe</i> 826	74
9.2. Construcción de plásmidos para la interrupción por recombinación homóloga de los genes <i>ATG4</i> y <i>ATG17</i>	77
10. CONCLUSIONES	96
11. PERSPECTIVAS	97
12. BIBLIOGRAFÍA	98
13. ANEXO: REACTIVOS	103
13.1. Medios de cultivo	103
13.2 Reactivos para transformación y lisis	104
13.3 Electroferogramas	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Homología de las vías de señalización involucradas en el control del envejecimiento en diferentes especies	11
Figura 2. Los procesos que intervienen en la regulación de la replicación y el envejecimiento cronológico	13
Figura 3. Esquematación de los tipos de autofagia	18
Figura 4. Proceso de autofagia	21
Figura 5. Sistemas de conjugación tipo ubiquitina en la autofagia	22
Figura 6. Esquematación de los tipos de autofagia	24
Figura 7. Modelo esquemático del rol dual de deconjugación en la formación de autofagosomas	26
Figura 8. Regulación del complejo Atg1 en levadura y complejo ULK1/2 en mamíferos	27
Figura 9. Envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i>	33
Figura 10. Niveles de ARNm de genes de autofagia y proteasas en condiciones de envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i>	34
Figura 11. Envejecimiento cronológico de <i>S. pombe 826</i>	66
Figura 12. Evaluación de las características fenotípicas de <i>S. pombe</i> en los días 1, 2, 5, 8, 12 y 18 de CLS	66
Figura 13. Optimización de condiciones de PCR para los genes HPT1, SDH1 y ATG18a	69
Figura 14. Curvas estándar de los transcritos de Hpt1, Sdh1, Atg18a, Atg17 y Atg4	70
Figura 15. Curvas de melting de los transcritos de Sdh1, Hpt1, Atg18a, Atg17 y Atg4	71
Figura 16. Curvas de validación de los transcritos de Atg18a, Atg17 y Atg4	71
Figura 17. ARN total de células de <i>S. pombe 972</i> en condiciones de envejecimiento cronológico	72
Figura 18. Niveles de expresión de ARNm de los genes ATG4 y ATG17 en condiciones de envejecimiento cronológico en la levadura <i>S. pombe 972 h-</i> en medio EMM	73
Figura 19. ARN total de células de <i>S. pombe 826</i> en condiciones de envejecimiento cronológico	75
Figura 20. Nivel de ARNm de los genes ATG4, ATG17 y ATG18a en condiciones de envejecimiento cronológico en la levadura <i>S. pombe 826</i> en medio YE con glucosa al 2%.	75
Figura 21. Estrategia para la construcción de cassette interruptor	79
Figura 22. Esquema general de interrupción de los genes ATG4 y ATG17 utilizando un cassette de interrupción por recombinación homóloga y obtención de	80

las posibles mutantes Δ Atg4 y Δ Atg17

Figura 23. Amplificación por PCR de las secuencias para la construcción de la interrupción de los genes <i>ATG4</i> y <i>ATG17</i> .	81
Figura 24. Purificación de ADN plasmídico y comprobación por PCR de los insertos AB y CD y el gen <i>URA4</i>	82
Figura 25. Ligación de los fragmentos CD con <i>URA4</i> .	83
Figura 26. Ligación de los fragmentos AB con <i>URA4-CD</i>	84
Figura 27. Confirmación por PCR en colonia de las colonias transformantes con el fragmento Δ ATG4 y Δ ATG17	85
Figura 28. Mapa de los vectores pJET- Δ atg4 y pJET- Δ atg17	86
Figura 29. Digestión enzimática de los plásmidos pJET recombinantes Δ atg4 y Δ Atg17	87
Figura 30. Contexto genómico de los genes <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> y <i>URA4</i> de <i>S. pombe</i>	88
Figura 31. Linearización de los plásmidos pJET- Δ ATG4 y pJET- Δ ATG17.	89
Figura 32. Comprobación por PCR en colonia de las transformantes de <i>S. pombe</i> 3D Δ Atg4 y Δ Atg17	90
Figura 33. Comprobación por PCR de las transformantes <i>S. pombe</i> 3D Δ Atg4 y Δ Atg17	91
Figura 34. Comprobación por PCR en colonia de las transformantes <i>S. pombe</i> 3D Δ Atg4 y Δ Atg17	92
Figura 35. PCR en colonia de las colonias transformantes de <i>S. pombe</i> 3D Δ ATG4 y Δ ATG17	93
Figura 36. PCR de las colonias transformantes de <i>S. pombe</i> Δ ATG4 y Δ ATG17	94
Figura 37. PCR en colonia de cepas de <i>S. pombe</i>	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas para la evaluación de los genes <i>ATG4</i> , <i>ATG17</i> y <i>ATG18</i>	39
Tabla 2. Genes utilizados	40
Tabla 3. Criterios para el diseño de oligonucleótidos para qPCR	41
Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación del fragmento del gen por PCR de punto final	43
Tabla 5. Condiciones de reacción para la amplificación de un fragmento de cada gen por PCR de punto final	44
Tabla 6. Mezcla de reacción para el tratamiento con DNAsa del ARN total y condiciones de incubación	44
Tabla 7. Mezcla de reacción para la reacción retrotranscripción y condiciones de temperatura para el termociclador para generar curvas estándar	45
Tabla 8. Mezclas de reacción para la generación de curvas estándar para qPCR por el método de cuantificación relativa	45
Tabla 9. Condiciones de reacción para la amplificación de ARNm por qRT-PCR para la generación de curvas estándar con curva de Melting	46
Tabla 10. Secuencias nucleotídicas de los primers para la construcción de los cassettes interruptores.	51
Tabla 11. Condiciones para la ligación con el vector de clonación pJET1.2 blunt	54
Tabla 12. Mezcla de reacción para la identificación de colonias positivas de <i>E. coli</i> por PCR en colonia	55
Tabla 13. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR en colonia	55
Tabla 14. Condiciones de para reacciones de digestión enzimática	57
Tabla 15. Condiciones para la ligación con el vector de clonación CD-pJET1.2 blunt + URA4	59
Tabla 16. Condiciones de para reacciones de digestión enzimática	60
Tabla 17. Cepas utilizadas para la transformación de <i>S. pombe</i>	61
Tabla 18. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR en colonia de <i>S. pombe</i>	63
Tabla 19. Oligonucleótidos diseñados para qRT-PCR	68

RESUMEN

El envejecimiento es referido como el deterioro progresivo de las funciones fisiológicas a nivel tisular, celular y molecular, donde existe una gran acumulación de daño debido a una pérdida en la homeostasis, lo que lleva a un individuo a disminuir su calidad de vida, adquirir enfermedades crónico degenerativas y posteriormente la muerte. Por lo que se ha aumentado el interés en su estudio y se han ocupados diferentes modelos biológicos como la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Durante el envejecimiento cronológico en levaduras se han identificado diversos procesos metabólicos alterados, entre ellos una disminución en la eficiencia de la autofagia, un proceso que se encarga de reciclar gran cantidad de componentes celulares y disminuir la cantidad de moléculas y organelos dañados. Debido a su importancia, en el presente trabajo se analizaron los niveles de ARNm de los genes ATG4 que codifica para una cistein proteasa encargada escindir a Atg8 para su posterior lipidación, ATG17 que codifica para una subunidad del complejo de inducción específica de autofagia y ATG18a que codifica para una una proteína de unión a fosfoinositidos, requerida durante la formación de autofagosomas, por qRT-PCR en condiciones de envejecimiento cronológico el cual asemeja al envejecimiento en células somáticas, encontrando que en condiciones de crecimiento en medio mínimo los genes ATG4 y ATG17 disminuyen a partir del día 6 de cultivo, por otro lado, si se hace la evaluación de éstos genes en condiciones de crecimiento en un medio rico, éstos aumentan significativamente desde el día 6 y regresan a niveles basales al día 11, indicando que las condiciones nutricionales son cruciales durante el envejecimiento cronológico, lo mismo se observó al evaluar el nivel de ATG18a en condiciones de envejecimiento cronológico en medio rico, lo cual es indicativo de que tiene un papel importante en el proceso de autofagia durante el envejecimiento. Además, se hizo la construcción de los cassette de reemplazo génico por recombinación homóloga de los genes ATG4 y ATG17, con una estrategia en la cual se hizo la clonación de los fragmentos flanqueados AB-ATG4, AB-ATG17, CD-ATG4, CD-ATG17 y el gen marcador URA4, posteriormente se hizo la digestión enzimática de cada uno de estos para poder ligarlos secuencialmente y finalmente obtener un

cassette de interrupción génica con la orientación BA-URA-DC para la posterior interrupción de los genes ATG4 y ATG17 y la caracterización del papel de éstos genes durante el proceso de autofagia y envejecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es definido en humanos como la pérdida de la capacidad reproductiva y el deterioro de las funciones fisiológicas conforme avanza la edad, que puede llevar a la enfermedad o a la muerte (Prasad, KN., 2010).

El envejecimiento es un proceso con bases genéticas definidas. Las mutaciones en el gen *daf-2* codificante para el receptor de tipo insulina aumentan la longevidad en el gusano *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, mientras que los ratones que carecen del receptor de insulina en el tejido adiposo son más longevos; por otro lado levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) han aportado información importante relacionada con el metabolismo de glucosa y de nitrógeno (Spong, A., 2010). Por su facilidad de manipulación análisis genéticos, debido a su velocidad de crecimiento y protocolos bien establecidos para su manipulación, los estudios en la levadura de fisión *S. pombe* han sido fundamentales para descubrir mecanismos conservados de envejecimiento (Lin, SJ., 2014). Para el estudio del envejecimiento en levaduras se tienen dos modelos: envejecimiento replicativo, definido como el número de células hijas producidas antes de la muerte y el envejecimiento cronológico (CLS), definido como la duración de la supervivencia de la levadura en fase estacionaria, éste proporciona un modelo de envejecimiento de las células que no se dividen equiparable a las células somáticas en eucariotas superiores. Hasta la fecha se conoce que ambas formas de envejecimiento son moduladas por las vías Tor/Sch9 y Ras/cAMP/PKA (Roux, AE., 2006). La actividad río abajo de las proteínas que participan en la autofagia, el equilibrio redox y la función mitocondrial, tienen influencia en el envejecimiento tanto de levaduras como de mamíferos. La restricción calórica retrasa tanto el envejecimiento replicativo como el cronológico, lo cual ha sido relacionado con la disminución en la actividad de Tor, Pka1 y Sck2 en respuesta a la disposición de nutrientes.

Estudios recientes, demostraron que la regulación de genes de autofagia pueden tener un impacto en el fenotipo de las levaduras en el CLS (Morselli, E., 2009; Roux, AE., 2010)

Por lo que, es necesario el estudio de las rutas genéticas que determinan el envejecimiento a nivel celular para entender mejor este proceso y, en un momento dado, ser capaces de modificarlo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Envejecimiento

El estudio del envejecimiento es un tema de gran interés global, ya que en las últimas décadas, han descendido los niveles de natalidad, ha aumentado de la esperanza de vida y disminuido el número de jóvenes. El cambio demográfico trae consigo la pérdida de la pirámide poblacional clásica, la cual se ha ido deformando en los últimos años. Según las proyecciones estadísticas del Consejo Nacional de Población (CONAPO), se estima que ésta perderá totalmente su forma trayendo una población totalmente heterogénea en los próximos 20 años, siendo cada vez más grande el número de adultos mayores que de jóvenes en el año 2050, donde la media de la población pasará de 28.0 años en 2005 a 42.7 años en 2050 (CONAPO, 2012).

El envejecimiento en humanos es el resultado de procesos biológicos complejos que están influenciados por la genética, el medio ambiente, la dieta y factores relacionados al estilo de vida. El envejecimiento en el ser humano puede ser definido como la pérdida gradual de la función de órganos y tejidos, lo cual podría llevar al individuo a la muerte. Definir el envejecimiento a nivel genético es difícil, ya que este proceso está dado por mecanismos complejos de expresión de genes que pueden verse alterados en la misma célula durante el envejecimiento, llevándola a la pérdida de la homeostasis, acumulación de proteínas dañadas y el progresivo daño de organelos que la llevarán paulatinamente a la muerte (Prazad, KN., 2010). Este deterioro es el principal factor de riesgo para el desarrollo de las principales patologías humanas como cáncer, diabetes, trastornos

cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Campsi, J., 2013). La investigación del envejecimiento ha experimentado un avance sin precedentes en los últimos años, en particular con el descubrimiento de que la velocidad del envejecimiento puede ser modificada, por vías genéticas y procesos bioquímicos conservados en la evolución. López en 2013 enumeró nueve mecanismos clave que representan denominadores comunes de envejecimiento en diferentes organismos, tales como la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, la desregulación en el censado de nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de células madre y las alteraciones en la comunicación celular (López, O., 2013). El envejecimiento generalmente se acompaña de un aumento del estrés intracelular debido a todos los factores anteriores; entre los mecanismos que se ven aumentados en respuesta al estrés destaca la autofagia, ya que se ha observado que en condiciones de limitación de aminoácidos, factores de crecimiento y otros nutrientes, además de la presencia de macromoléculas dañadas o agregadas, el proceso de autofagia se ve potenciado. La autofagia es uno de los mecanismos de supervivencia de las células durante el estrés extrínseco e intrínseco, cuyas consecuencias biológicas dependen del nivel de estrés (Periyasami, S., 2009).

2.2. Modelos de estudio del envejecimiento

Los primeros estudios de envejecimiento se hicieron en *Caenorhabditis elegans* y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y con ellos se descubrió que la mutación de un solo gen puede alterar la longevidad, se han identificado diversos genes y mutaciones, que tienen impacto en el envejecimiento de levaduras, gusanos, insectos y mamíferos (Spong, A., 2010). La activación de vías de sensado de nutrientes pro-crecimiento (IIS) inhibe la actividad de factores de transcripción de resistencia al estrés (Gis1, Msn2/4, DAF-16, dFOXO), reduce la protección celular y la acumulación de lípidos y glucógeno, y promueve el envejecimiento. Algunas mutaciones que reducen la actividad de estas vías prolongan la esperanza de vida (Bartke, A. 2005). En levaduras y gusanos esta extensión de la longevidad requiere la activación de mecanismos de respuesta al

estrés dependientes de *Gis1/Msn2/4* y *Daf-16*, lo cual permite la activación de enzimas antioxidantes y proteínas de choque térmico (Fabrizio, P. 2001). En moscas la sobreexpresión de *dFOXO* extiende la esperanza de vida media por la activación de la vía de respuesta al estrés, análoga de levaduras y gusanos (Panowski, SH., 2005). En ratón, la reducción de la vía IIS por la mutación del gen del receptor IGF-1 o por disminución en la síntesis de la hormona del crecimiento (GH) se promueve la longevidad y la resistencia al estrés posiblemente por activación de los factores de transcripción *FoxOs*. GH también puede tener una función promoviendo el envejecimiento de manera independiente de la señalización de IGF-1, ésta puede ser dependiente de la señalización beta-adrenérgica con la delección del gen de la adenilato ciclasa 5 (*AC5*), o bien reduciendo la actividad de la PKA. Dada la homología en diversas vías de regulación del metabolismo de carbohidratos, se valida la utilización de cualquiera de éstos organismos para el estudio del envejecimiento (**Figura 1**) (Fabrizio, P., 2001; Clancy, DJ., 2001; Longo, VD., 2003).

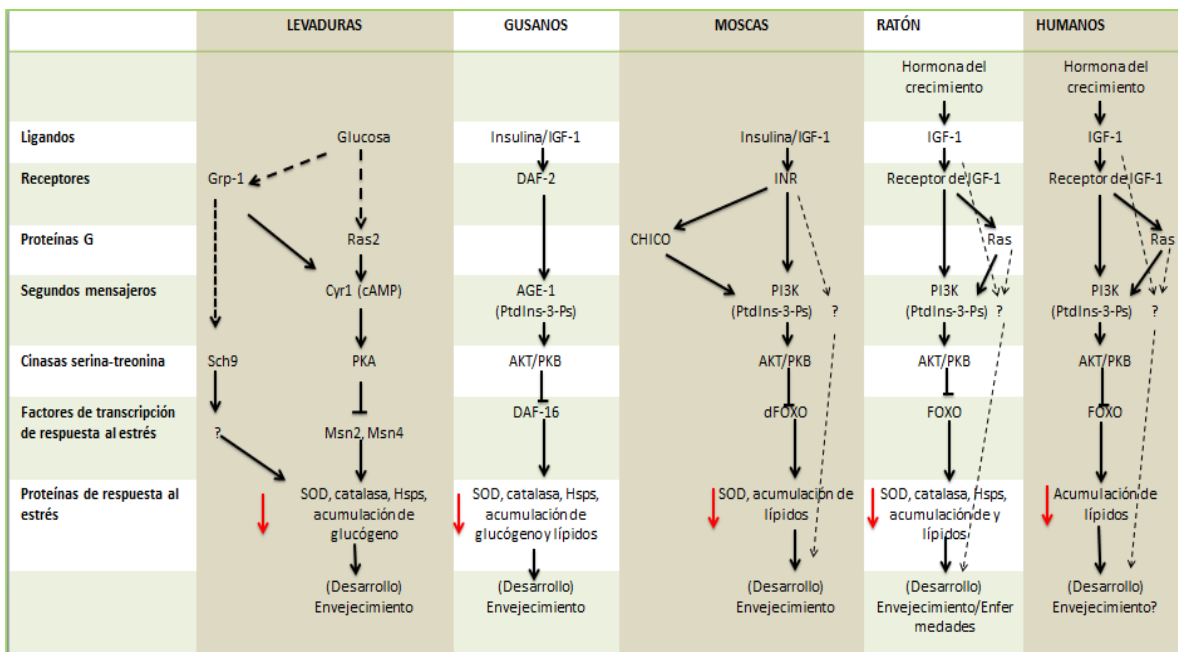


Figura 1. Homología de las vías de señalización involucradas en el control del envejecimiento en diferentes especies (Tomado y modificado de Longo, VD., y Fabrizio, P. 2012).

El uso de las levaduras ha aportado información importante al estudio de las vías y mecanismos que regulan la longevidad, gracias a ellas se ha descubierto que existe una conservación de las principales vías regulatorias de la longevidad y son excelentes modelos para obtener información sobre los cambios metabólicos que existen durante el envejecimiento, entre las más usadas se encuentran *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

2.3. *Schizosaccharomyces pombe* como modelo de estudio del envejecimiento

Para el estudio del envejecimiento inicialmente se utilizó como organismo unicelular eucariota a *S. cerevisiae* ya que es de fácil manipulación y poco costoso, más tarde se exploró la posibilidad de utilizar a *S. pombe* encontrando muchas similitudes con eucariontes superiores tales como los procesos de splicing de ARN, mecanismos de reparación del ADN, la función de los telómeros, la presencia de un sistema de RNAi, además sus condiciones de cultivo son simples y similares a *S. cerevisiae* (Sipiczki, M., 2004).

Existen dos tipos de paradigmas de envejecimiento estudiados en la levadura. El envejecimiento replicativo definido como la cantidad de células hijas que puede tener una célula madre antes de morir y el envejecimiento cronológico definido por el tiempo que puede vivir una célula en la fase estacionaria sin aporte de nutrientes. Las condiciones ambientales determinan la proliferación, el comportamiento en el estado estacionario y la diferenciación, definiendo así los distintos paradigmas de envejecimiento. Diferentes procesos moleculares modulan la longevidad en la levadura, entre estos se encuentran la función mitocondrial, el control de calidad de proteínas y la señalización de nutrientes. Algunos de los mecanismos correspondientes en cada modelo de envejecimiento aún no han sido elucidados; algunos son generales como la inactivación de vías de señalización de nutrientes (Ras/PKA y TOR–Sch9) (**Figura 2**) (Carmona, D., 2014).

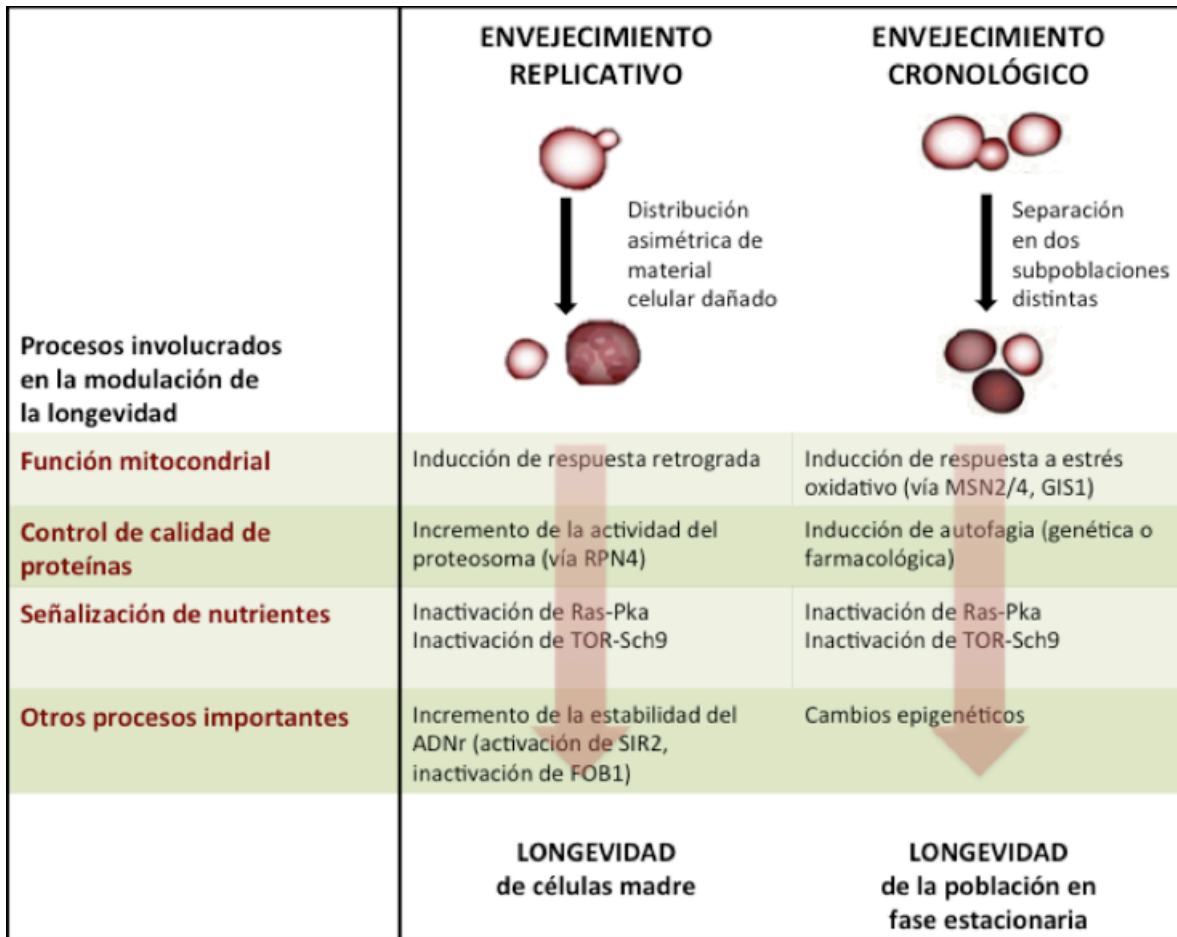


Figura 2. Los procesos que intervienen en la regulación de la replicación y el envejecimiento cronológico (Tomado y modificado de Carmona, D., 2014).

2.3.1. Características del envejecimiento cronológico

El envejecimiento cronológico en levaduras ha sido usado satisfactoriamente para estudiar los mecanismos causantes de la inestabilidad genómica dependiente de la edad permitiendo la identificación del daño oxidativo al ADN y los sistemas de reparación a prueba de errores como clave para la acumulación de mutaciones observadas durante el envejecimiento cronológico (Breitenbach, M. 2012).

Una de las ventajas del envejecimiento cronológico (CLS) es que se puede medir la supervivencia de células en estado quiescente, este puede servir tanto

como modelo de envejecimiento de células de mamífero pos-mitóticas así como modelo muy simple de envejecimiento de un organismo. El monitoreo del CLS es extremadamente simple, no requiere micromanipulación, ya que se basa en el uso de cultivos de millones de células, el cual facilita el monitoreo de la longevidad de mutantes y permite el uso de un amplio número de ensayos genéticos, genómicos y bioquímicos. Un ensayo estándar de CLS en levaduras incluye el cultivo de la levadura en un medio completo hasta que el agotamiento de nutrientes promueve el arresto del ciclo celular. La mayoría de las células detiene la división celular después de 2 o 3 días después de cultivo, la viabilidad usualmente se mide por ensayos de unidades formadoras de colonias o tinciones de viabilidad usando colorantes como floxina B o azul de tripán (Roux, AE., 2006).

Se han usado cuatro tipos de medios de cultivo en *S. pombe* para ensayos de CLS: medio sintético EMM (Edimburgo Medio Mínimo) completado con todos los aminoácidos, medio sintético dextrosa (SD), medio rico basado en extracto de levadura YE suplementado con componentes auxotróficos y medio mínimo EMM solo, estos se mantienen en agitación y aireación a 29 °C desde días hasta semanas, durante los cuales se puede medir la clonogenicidad de la levadura en la fase estacionaria y se ha observado que existe un decaimiento exponencial de la clonogenicidad entre la primera y la tercera semana. Las células observadas en estas condiciones se encuentran en inanición y su supervivencia depende a largo plazo de la respuesta genética a las condiciones de inanición resultando en un gran número de cambios morfológicos y fisiológicos. Entre los cambios y problemas que se experimentan en esta etapa destacan algunos defectos en la remoción de moléculas dañadas por mecanismos como la autofagia. Una de las principales características en el envejecimiento cronológico de levaduras es la presencia de dos poblaciones en la fase estacionaria, una de las cuales se compone de células jóvenes (hijas) morfológicamente diferenciadas, con baja actividad metabólica y longevas, mientras que la otra población es propensa a la muerte por apoptosis y una vez lisada pueden servir como alimento para la adaptación de la población joven (Fabrizio, P., Longo, VD., 2008; Allen, C., 2006).

Una de las condiciones más estudiadas durante el envejecimiento cronológico ha sido la restricción calórica, ya sea reemplazando el medio de cultivo por agua, cambiando la composición de aminoácidos o bajando la concentración de glucosa desde el 2 % al 0.05 % en medios como el YE o el SD, donde se ha observado que se incrementa el tiempo de vida media de la levadura (Roux, AE., 2009). Sin embargo, este fenómeno no se observa en medio EMM; se ha propuesto que el crecimiento en medio sintético es similar a la restricción calórica donde dominan los efectos de una respiración celular aumentada sobre los efectos de la restricción calórica, esta hipótesis se refuerza por la observación de que en medio mínimo, la velocidad de respiración se eleva incluso en altas concentraciones de glucosa, similar a lo que pasa en bajas concentraciones de glucosa en medio rico. Se ha demostrado que incluso la sobrenutrición de glucosa en medio EMM puede potenciar débilmente la esperanza de vida, en este caso, una gran disponibilidad de energía parece ser de ayuda y parece favorecer el mantenimiento de las funciones para incrementar el CLS porque la restricción calórica se alcanza independientemente de la glucosa. Alternativamente, la vía de señalización de glucosa podría ser alterada en el medio EMM, lo cual es consistente con el hecho de que las mutaciones en esta vía viven más a pesar de crecer en un medio con altos niveles de glucosa. El uso de diferentes medios de cultivo puede incrementar la esperanza de vida en *S. pombe* probablemente ligados a la restricción calórica, con el hecho de que el crecimiento en medio EMM tiene una mayor esperanza de vida comparada con un medio rico como el YE. Las vías implicadas en aumentar la esperanza de vida son aquellas que tienen que ver con la señalización de nutrientes Sck2/Tor/Pka1, la vía de respuesta a estrés activada por la cascada de las Wis4/Wis1/Sty1 MAP cinasas, las cuales convergen en la activación de factores y vías de respuesta a estrés como la autofagia (Roux, AE., 2010).

2.4. Autofagia

Durante el crecimiento y desarrollo celular normal, existe un balance entre la biosíntesis y el catabolismo de macromoléculas. Este balance es preservado por diversos mecanismos que responden a las circunstancias del medio ambiente y estimulan vías de señalización específicas en los sistemas de respuesta al desarrollo y crecimiento. En este proceso, hay una invariable producción de componentes que pueden ser tóxicos para la célula. Los cuales deben ser reconocidos para su apropiada degradación, mantener la función y viabilidad celular. Comúnmente las proteínas dañadas provocan interacciones intermoleculares anormales que forman agregados, que al ser atrapadas dentro otros componentes celulares son citotóxicos. En células eucariotas, los principales sistemas responsables para la degradación de organelos dañados y de proteínas no funcionales son el proteosoma vía ubiquitina y el sistema lisosomal. La vía del proteosoma está restringida al citoplasma y el núcleo y se involucra en la degradación de proteínas de vida media corta. El sistema lisosomal comprende una variedad de hidrolasas incluidas proteasas para la degradación de proteínas de vida media larga y otros componentes citoplasmáticos. La principal vía que dirige los componentes citoplasmáticos hacia el lisosoma para su degradación es la autofagia (Klionsky, DJ., 2000).

La autofagia en un proceso celular durante el cual una porción del citoplasma se envuelve en una estructura de doble membrana llamada autofagosoma, la cual madura y se fusiona con lisosomas para la degradación de su contenido. En el centro de la maquinaria molecular de autofagia se encuentran una familia de genes o proteínas llamadas Atg. Originalmente identificadas en levadura, los ortólogos de Atg también se han encontrado en células de mamíferos y han mostrado que juegan un papel importante en el proceso de autofagia. Tradicionalmente, la autofagia se ha reconocido como una respuesta al estrés por inanición de nutrientes, donde las células digieren organelos citoplasmáticos y macromoléculas dirigidos a reciclar nutrientes para su auto soporte. Sin embargo, la autofagia es una respuesta al estrés, dependiendo de las condiciones celulares,

puede inducir directamente la muerte celular o un mecanismo de supervivencia celular, el cual cuando se ve alterado puede llevar a las células al envejecimiento o a diversas patologías relacionadas con la edad (Mizushima, N., 2007; Klionsky, DJ., 2003).

La autofagia es constitutiva en todos los tipos de células eucariotas que contienen un compartimento lisosomal. La autofagia basal contribuye a la degradación de proteínas de vida larga así como la regulación de la cantidad de organelos y ocurre en paralelo con la vía proteasomal para controlar la calidad o la salud del citoplasma (Bergamini, 2007).

2.4.1. Tipos de autofagia

La autofagia, un término derivado del griego *auto* (uno mismo) y *phagos* (comer), significa comerse a sí mismo. En una célula, se han reconocido tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia, y la autofagia mediada por chaperonas (**Figura 3**). La macroautofagia comienza con la formación de un fagóforo o preautofagosoma que es una membrana de aislamiento que envuelve una parte del citoplasma donde se incluyen las proteínas dañadas y organelos dañados también llamados *cargo*. La membrana de aislamiento se cierra para formar un autofagosoma, que posteriormente se fusiona con un lisosoma para la degradación del *cargo* por medio de hidrolasas lisosomales. La microautofagia implica la inmersión de una porción del citoplasma instantáneamente en la membrana lisosomal por invaginación, protrusión y separación. La autofagia mediada por chaperonas es un proceso de transporte directo de proteínas desplegadas a través de la chaperonina lisosomal hsc70 y LAMP-2^a, un receptor de membrana lisosomal. Además existen tipos de autofagia específica como la Mitofagia encargada de la degradación específica de mitocondrias, Microautofagia de núcleo, Micropexofagia y Macropexofagia donde se degradan específicamente los peroxisomas, entre otros. De los tipos, la macroautofagia es la más frecuente y se nombra comúnmente como “autofagia” (Yen, WL., 2008).

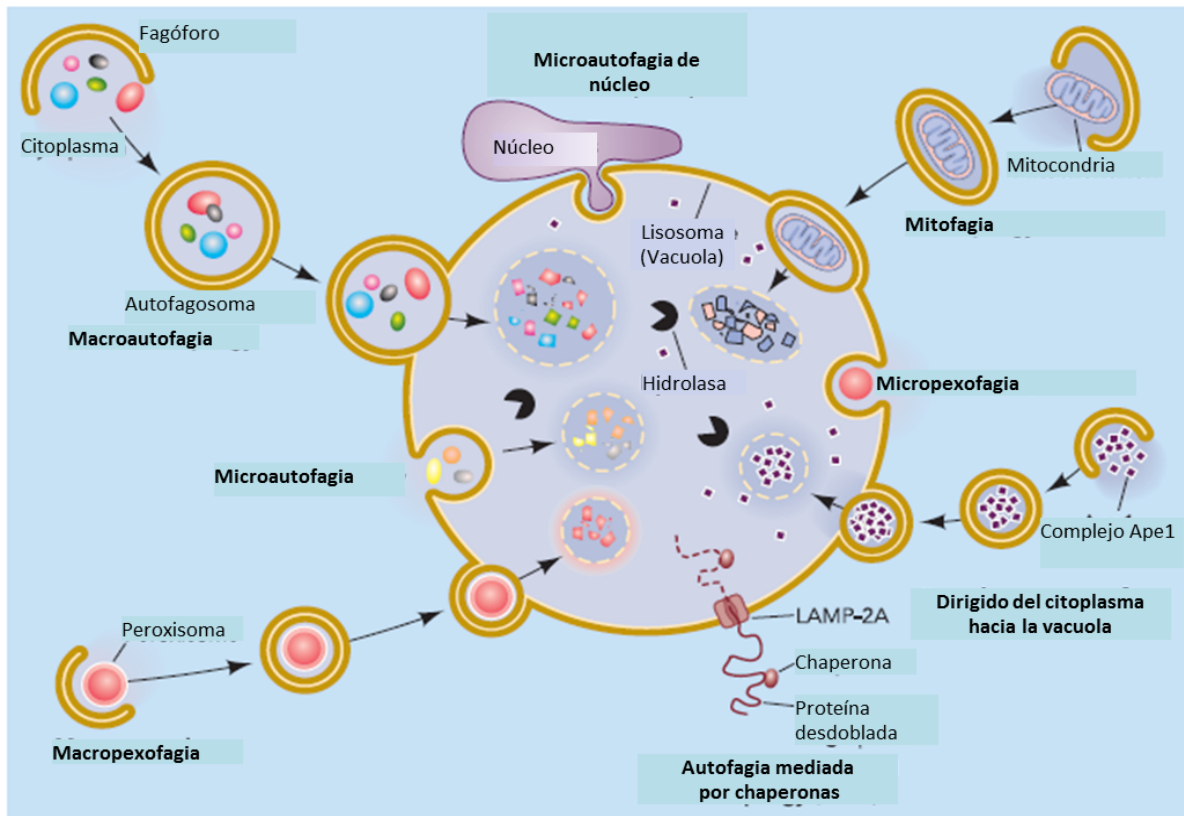


Figura 3. Esquemización de los tipos de autofagia (Tomado y modificado de Yen, WL., 2008).

2.4.2. Maquinaria central de autofagia

La autofagia es críticamente importante para la supervivencia de organismos unicelulares así como las levaduras, las cuales se encuentran expuestas directamente al medio ambiente, por lo que la caracterización molecular de éste proceso empezó con la identificación de genes relacionados con la autofagia (ATG) en *S. cerevisiae*. Se han clonado más de 30 genes ATG para su caracterización e identificación en el proceso de autofagia, en particular, se han identificado los ortólogos Atg de mamíferos mostrando una alta conservación de los genes en la levadura. Las proteínas Atg constituyen la maquinaria molecular núcleo de la autofagia, que está implicada en la inducción de la membrana de aislamiento, la selección y secuestro del cargo, la formación de las vesículas autofágicas, y la fusión con lisosomas (Huang, J., 2007; Nakatogawa, H., 2009).

El proceso de autofagia procede a través de 5 pasos mecánicos distintos: (1) inducción, (2) nucleación de la doble membrana y formación del fagóforo, (3) elongación del autofagosoma y secuestro del cargo o parte del citoplasma a degradar, (4) fusión del autofagosoma y el lisosoma, y (5) degradación de los componentes dentro del lisosoma (**Figura 4**) (Feng, Y., 2014). El primer paso involucra la formación del complejo de iniciación Atg1 el cual es regulado principalmente por las cinasas TOR y AMPK, las cuales son dependientes del balance entre la energía externa y el aporte de nutrientes. La formación de éste complejo permite la creación de una membrana o fagóforo y la formación del autofagosoma. La membrana usada para la formación del fagóforo puede provenir del retículo endoplásmico, mitocondria, aparato de Golgi, endosomas y la membrana plasmática. Para el paso 2 es necesaria la integración de lípidos de membrana dentro del fagóforo y la síntesis de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) que sirve como un punto de referencia en la membrana para reclutar otros factores involucrados en el proceso de formación del autofagosoma, el PI3P es sintetizado por el complejo de nucleación fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La PI3K es reconocida por proteínas de unión a PI3K, lo cual hace posible que actúe como un vector para la transferencia de lípidos de membrana entre una membrana donadora y el fagóforo creciente, además de que su interacción con proteínas como Atg18 es esencial para mantener la morfología vacuolar y la actividad autofágica (Obara, K., 2011; Xie, Y., 2015). En el paso 3 la elongación del fagóforo es dependiente de dos reacciones de conjugación tipo ubiquitina. En la primera la proteína tipo ubiquitina Atg12 es unida covalentemente a Atg5 por Atg7 y Atg10. El conjugado Atg12-Atg5 hace una interacción con Atg16 y una vez formado el complejo actúa como una ligasa para promover la conjugación del lípido fosfatidiletanolamina (PE) a la proteína Atg8-I proveniente de la escisión de la proteína tipo ubiquitina Atg8 por la proteína Atg4. El conjugado Atg8-PE se une a la membrana del fagóforo y es importante tanto para su elongación como para el reconocimiento del cargo, ya que éste se puede unir a varios receptores como por ejemplo p62, el cual reconoce proteínas ubiquitinizadas u organelos etiquetados para su degradación. El sistema de conjugación tipo ubiquitina y el sistema de

ciclación dependiente de Atg9 contribuyen con la elongación del fagóforo, participando en el aporte de membrana desde la fuente hacia la expansión del fagóforo, una vez que el fagóforo madura para encapsular completamente el cargo y es llamado autofagosoma (Lapierre, LR., 2015; Xie, Y., 2015). En el paso 4 el autofagosoma completado se mueve a lo largo de los microtúbulos de manera dependiente de dineínas por medio de interacciones con Atg8 para acercarse a los lisosomas, libera las proteínas relacionadas a autofagia asociadas a la membrana, después de esto está listo para interaccionar y fusionarse con el lisosoma ayudado por proteínas de la familia SNARE para formar un autolisosoma, una vez fusionados, en el paso 5 la membrana interna del autolisosoma y el cargo son degradados por hidrolasas lisosomales mientras las macromoléculas resultantes son devueltas al citoplasma a través de transportadores de membrana para su reciclaje, y el autolisosoma se transforma nuevamente en un lisosoma en un proceso llamado reformación del lisosoma autofágico, necesario para mantener la homeostasis lisosomal durante la autofagia y así tener lisosomas disponibles para otro evento de fusión vesicular (Monastyrska, I., 2009; Chen, Y., 2017; Monreau, K., 2011). Cuando el proceso no llega a completarse, se forman cuerpos residuales que contienen material indigerible, la acumulación de éstos ha sido detectada en enfermedades relacionadas con el envejecimiento, lo cual sugiere que la habilidad de las células para coordinar eficientemente el proceso de autofagia que se deteriora gradualmente con la edad (Lapierre, LR., 2015)

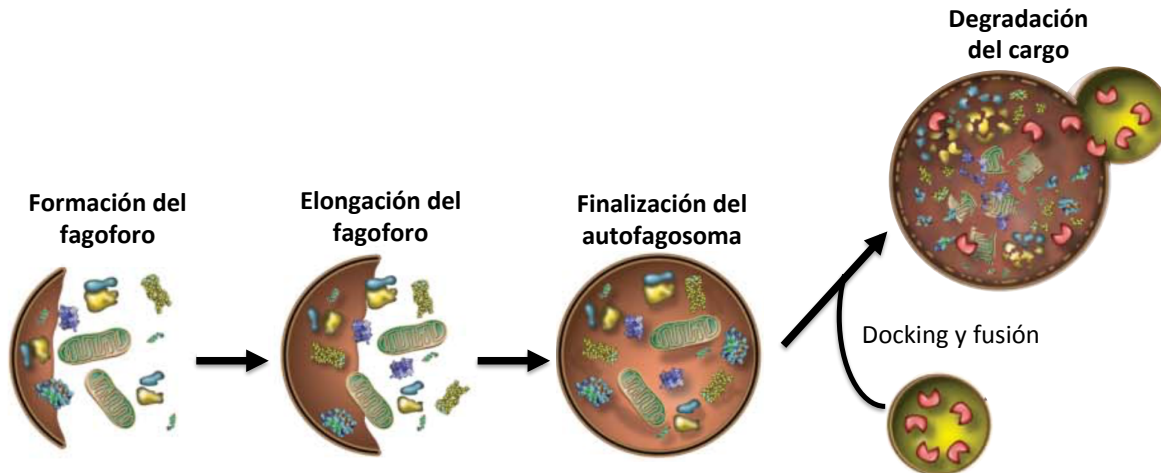


Figura 4. Proceso de autofagia. El proceso de autofagia es iniciado por la nucleación del fagóforo con estructuras de doble membrana, continua con la elongación y el secuestro del cargo hasta su maduración a autofagosoma y posteriormente interactúa con un lisosoma y se fusiona para finalmente haciendo uso de la maquinaria lisosomal degradar el cargo (Tomado y modificado de Lapierre, LR., 2015).

La formación de los autofagosomas depende de varios Atgs que forman parte de dos sistemas de conjugación requeridos para la iniciación y la elongación de la membrana de aislamiento. El primer evento de conjugación implica la unión de una sola molécula de lípido, fosfatidiletanolamina (PE), al extremo carboxilo de la proteína Atg8. En este caso la conjugación se lleva a cabo por Atg7 y Atg3 que actúan como enzimas homólogas E1 (activación) y E2 (conjugación), respectivamente, en la vía de la ubiquitina. Para que se produzca esta conjugación, Atg8 se escinde inicialmente por Atg4 (proteasa de cisteína). La proteína Atg8 escindida (Atg8-I) se activa por Atg7 y más tarde es trasladado a Atg3. Atg3 conjuga Atg8-I a PE para formar Atg8-II (Atg8-PE), una forma lipídica asociada con las membranas o vesículas autofágicas (**Figura 5A**). El segundo evento de la conjugación de la autofagia implica la unión covalente de glicina C-terminal de Atg12 a Atg5 a través de un residuo de lisina interna. En esta conjugación, Atg7 y Atg10 actúan como enzimas homólogas E1 y E2, respectivamente. Atg7 hidroliza al ATP y activa a Atg12 a través de la formación de un enlace tioéster. El Atg12 activado se transfiere entonces a Atg5 vía Atg10. El complejo Atg5-Atg12 se une de forma no covalente a la proteína Atg16, que se

oligomeriza para formar grandes unidades que se requieren para dirigir a Atg8-PE hacia la membrana limitante del fagóforo y permite el alargamiento de ésta actuando como una enzima tipo ubiquitina E3 (ligasa) (**Figura 5B**). Ambos eventos de conjugación de la autofagia son interdependientes, así como la conjugación Atg8-PE depende de la actividad del complejo Atg5-Atg12-Atg16 (Fujioka, Y., 2010; Ichimura, Y., 2000; Itakura, E., 2010).

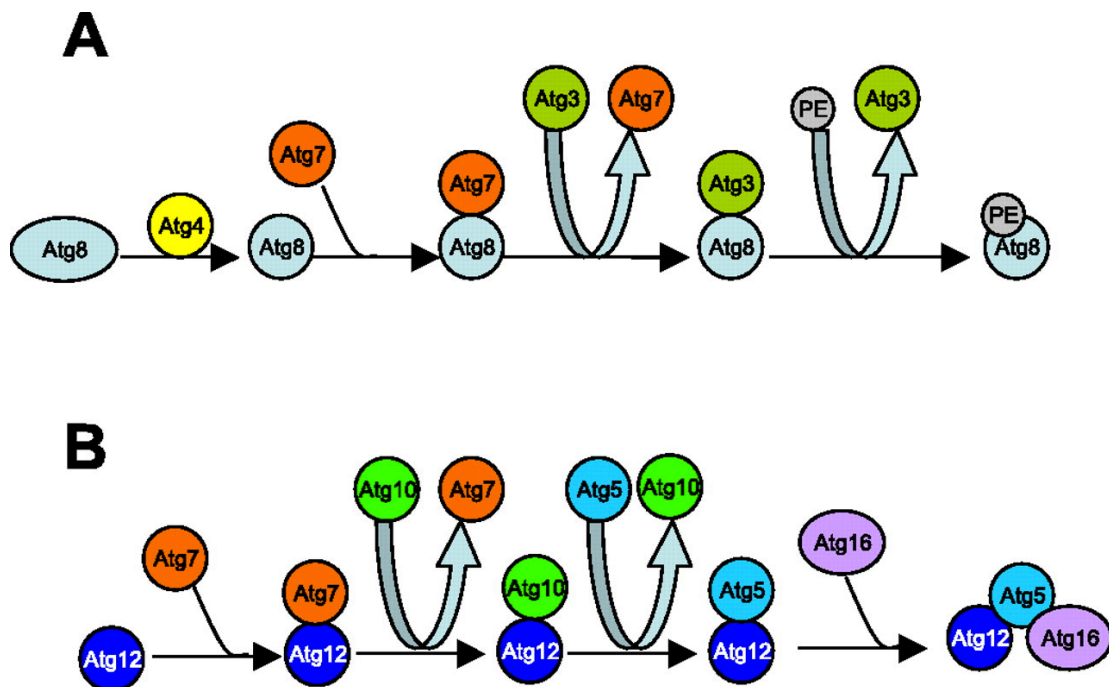


Figura 5. Sistemas de conjugación tipo ubiquitina en la autofagia. A) El primer sistema de conjugación incluye Atg8. B) el segundo sistema de conjugación incluye Atg12/5/16 (Tomado de Periyasamy, S., 2009).

Además de los sistemas de conjugación, la autofagia también está regulada por dos complejos de cinasa (Fig. 4). El primero incluye una fosfatidilinositol 3-quinasa de autofagia específica (PI3-cinasa), y Vps34 (homóloga de PI3-quinasa clase III en humano). Vps34 fosforila fosfatidilinositol (PI) para producir fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), un lípido de acoplamiento que promueve la formación de complejos de proteínas, cerrando la membrana, y por consiguiente el secuestro de componentes citoplasmáticos en las vacuolas autofágicas (**Figura**

6A). Vps34 se asocia con Vps15, Vps30 y Atg14, formando un complejo que juega un papel importante para focalizar los dos eventos de conjugación hacia las vacuolas autofágicas emergentes. El complejo de PI3-quinasa controla la nucleación de vesículas autofágicas y conduce a los eventos de conjugación (Periyasamy, S., 2009; Vanhaesebroeck, B., 2010).

El segundo complejo cinasa de autofagia se centra en Atg1 y Atg13. En el modelo clásico de la inducción por inanición de nutrientes de la autofagia, Atg13 es uno de los efectores río abajo del blanco de la rapamicina (TOR)2 cinasa (**Figura 6**). En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, TOR2 cinasa es activada y fosforila a Atg13, impidiendo su asociación con Atg1, (cinasa de serina/treonina). Bajo esta condición, Atg1 contribuye a la formación de vesículas portadoras de hidrolasas lisosomales pertenecientes a la vía Cvt, pero no autofagosomas (Lynch, MA. y Klionsky, DJ., 2010). Durante la inanición, la cinasa TOR2 se inhibe, se activan fosfatasas y desfosforilan a Atg13 que se asocia con Atg1 y lo activa, se recluta Atg17 y se forma el segundo complejo cinasa de la autofagia. El complejo formado Atg1-Atg13-Atg17 participa en el alargamiento de la membrana de aislamiento y la progresión hacia una estructura completa del autofagosoma (**Figura 6B**) (Periyasamy, S., 2009).

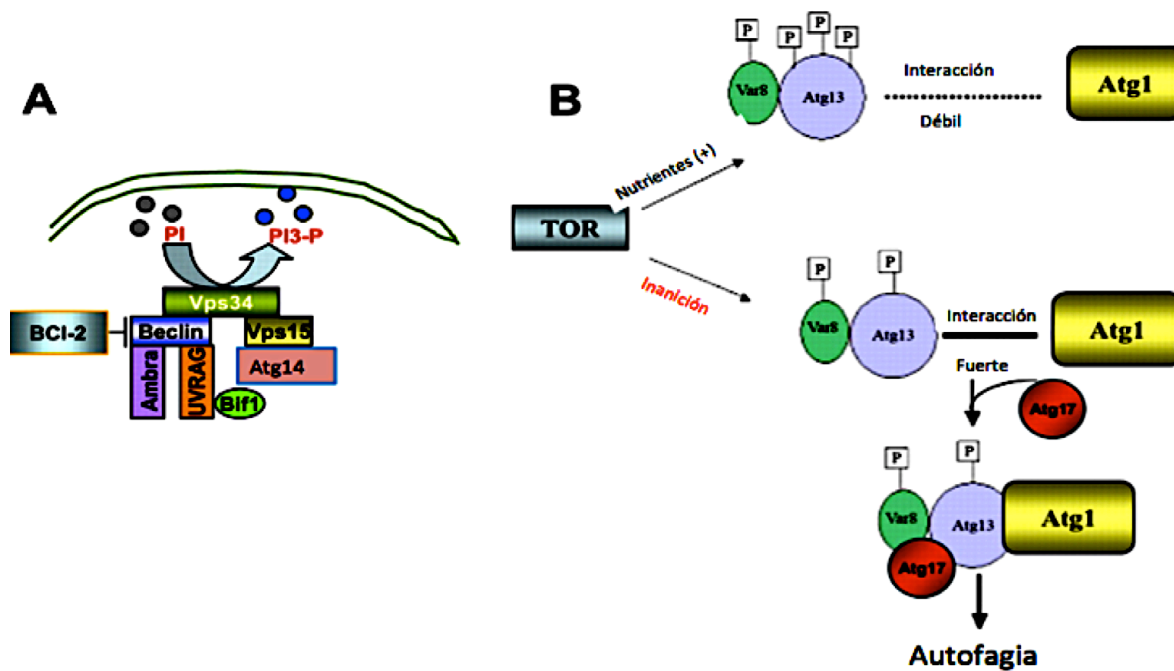


Figura 6. Dos sistemas de cinasas esenciales en la autofagia. A) Complejo fosfatidilinositol 3-cinasa. B) Proteínas del complejo serina/treonina cinasa (Tomado y modificado de Periyasamy S., 2009).

Una vez que el autofagosoma se completa, éste puede fusionarse con un lisosoma, formando un autolisosoma. La membrana interna de los autofagosomas y los componentes del citoplasma secuestrados son degradados por hidrolasas lisosomales. Una vez que las macromoléculas se degradan dentro del lisosoma, las unidades monoméricas se exportan al citosol para su reciclaje.

Otro complejo esencial para el proceso de autofagia está constituido principalmente por las proteínas Atg18 y Atg2, los cuales constituyen una segunda familia de efectores de la PI3P, particularmente Atg18 tiene la habilidad de unirse a PI(3,5)P2 y PI3P por un motivo de unión a fosfoinosítidos, que es la secuencia FRRG. La mutación de esta secuencia en la proteína, evita la unión con éstos lípidos y causa una morfología vacuolar anormal con una significativa reducción en la actividad de la autofagia. Se ha demostrado que es necesaria la unión con PI3P para la formación del autofagosoma, mientras que la unión con PI(3,5)P2 se requiere para mantener la morfología vacuolar. La formación del complejo Atg18-

Atg2 ocurre incluso de manera independiente del proceso de autofagia; No obstante, en condiciones de autofagia el PI3P recluta éste complejo hacia el PAS por la unión con el motivo FRRG de Atg18, una vez en el sitio de membranas el complejo se ve directamente involucrado en la formación de la membrana del autofagosoma, regulando la lipidación de Atg8 con PE por interacción con Atg16, la cual forma parte del complejo Atg5-Atg12 y se encarga de la elongación del autofagosoma. Además se ha involucrado en el reclutamiento de Atg8-PE hacia el PAS (Obara, K., 2011; Wesselborg, S., 2015)

Dentro de la maquinaria de autofagia cada proteína cumple un papel importante, dentro de éstas encontramos a 3 proteínas esenciales Atg4 y Atg17 y Atg18a.

- **Atg4**

La proteína Atg8 juega un rol crítico en el proceso de expansión del fagóforo. Atg8 se encuentra presente en ambos lados del fagóforo y presumiblemente en la parte interna, este tiene la función adicional de anclaje para receptores de las moléculas destinadas a degradarse. La asociación covalente favorece la conjugación de Atg8 a PE. La reacción *in vivo* es catalizada por la acción secuencial de Atg7, Atg3 y el complejo Atg12-Atg5-Atg16. La variante trunca de Atg8 contiene un residuo expuesto en el C-terminal (sustrato de la reacción de conjugación), proveniente de dos fuentes: a partir de la escisión de Atg8-PE o del procesamiento proteolítico de Atg8 recién sintetizada. En ambos casos, la escisión es catalizada por Atg4 (Xie, Z., 2007; Shintani, T., 2002; Ichimura, Y., 2000).

Se ha demostrado que la escisión de Atg8-PE por Atg4 juega un doble papel en el proceso de formación de la autofagosoma. En la etapa inicial, la liberación de Atg8 de depósitos transitorios por escisión dependiente de Atg4 (no provenientes del sitio de ensamble del fagóforo o PAS), es fundamental para mantener un suministro normal de Atg8 al PAS. En una fase avanzada de la formación del autofagosoma, la liberación de Atg8 de la membrana del fagóforo

facilita su maduración en autofagosomas con capacidad de fusión con una vacuola o un lisosoma (**Figura 7**). Se ha observado que en ausencia de escisión, el defecto en esta etapa no se puede superar mediante la sobreexpresión *Atg8*. Sin embargo, el direccionamiento de *Atg4* a la membrana vacuolar en las células con una donde no se lleva a cabo la escisión de manera efectiva provoca la restauración total del suministro de *Atg8* al PAS (Yu, ZQ., 2012)

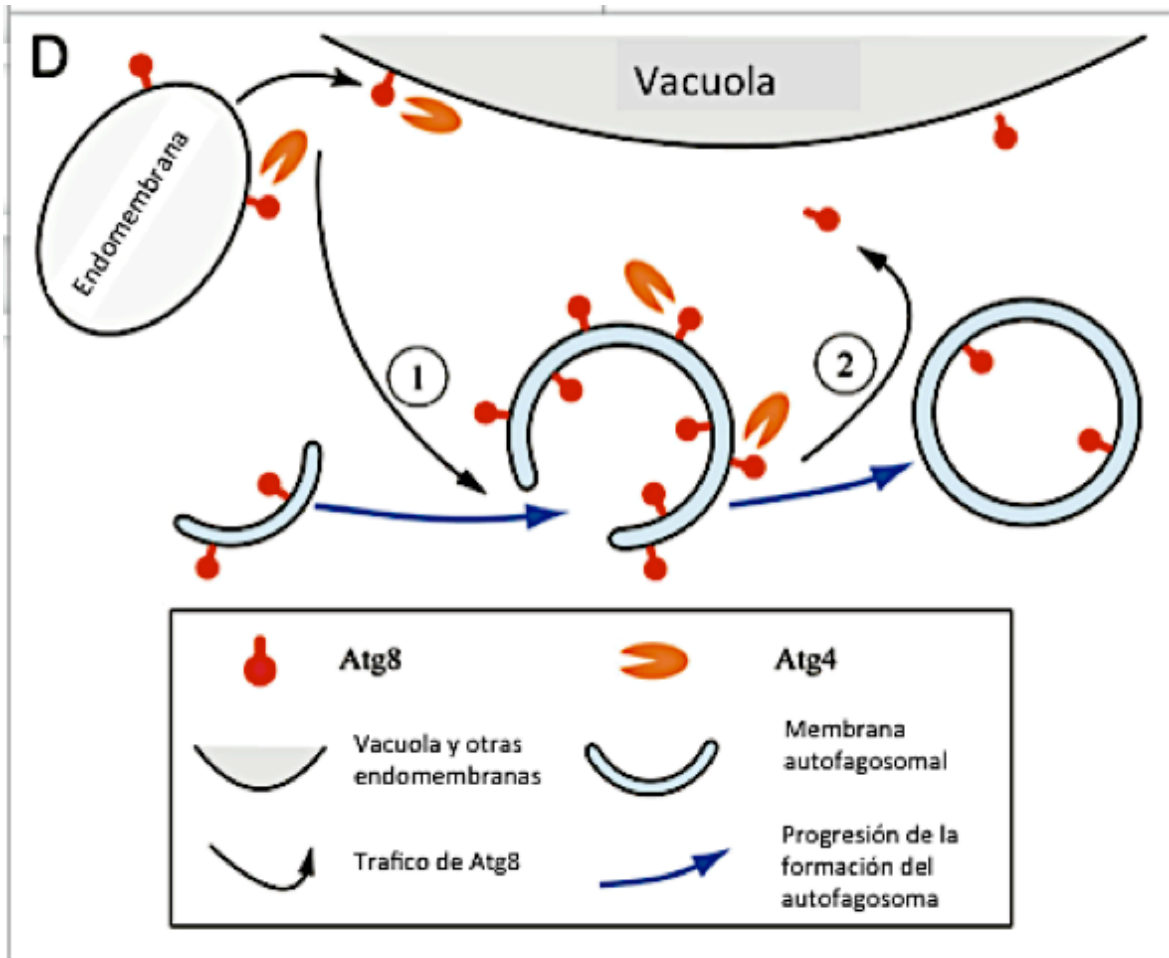


Figura 7. Modelo esquemático del rol dual de deconjugación en la formación de autofagosomas. 1. En la fase temprana de formación del autofagosoma, la deconjugación de *Atg8* en el PAS a partir de reservorios como vacuolas y otras endomembranas, 2. En la fase tardía, la deconjugación de *Atg8* a partir del fagóforo facilita su maduración en un autofagosoma capaz de fusionarse. (Tomado y modificado de Yu, ZQ., 2012)

- **Atg17**

En las levaduras, el complejo cinasa Atg1 contiene la única cinasa del núcleo de maquinaria de autofagia, Atg1, la subunidad reguladora Atg13, y componentes adicionales con el complejo Atg17-Atg31-Atg29, el cual es requerido para la macroautofagia no específica. En el caso de la vía CVT el complejo Atg17-Atg31-Atg29 es sustituido por el complejo Atg11-Atg20-Atg24 (**Figura 8**). Para la autofagia Atg17-Atg31-Atg29 forma un complejo ternario, el cual es autofagia específico. En levaduras la delección del gen *Atg17* favorece la formación de autofagosomas más pequeños. La interacción con el complejo Atg17-Atg31-Atg29 es necesaria para llevar a cabo la actividad cinasa del complejo Atg1. *Atg17* podría funcionar como estructura base para reclutar a otras proteínas hacia el PAS. La función de las proteínas *Atg29* y *Atg31* aún no se ha descrito; sin embargo, se sabe que su interacción con *Atg17* es esencial para ejecutar de manera eficiente el proceso de autofagia (Jin, M., 2013; Nice, DC., 2002; Susuki, K., 2007).

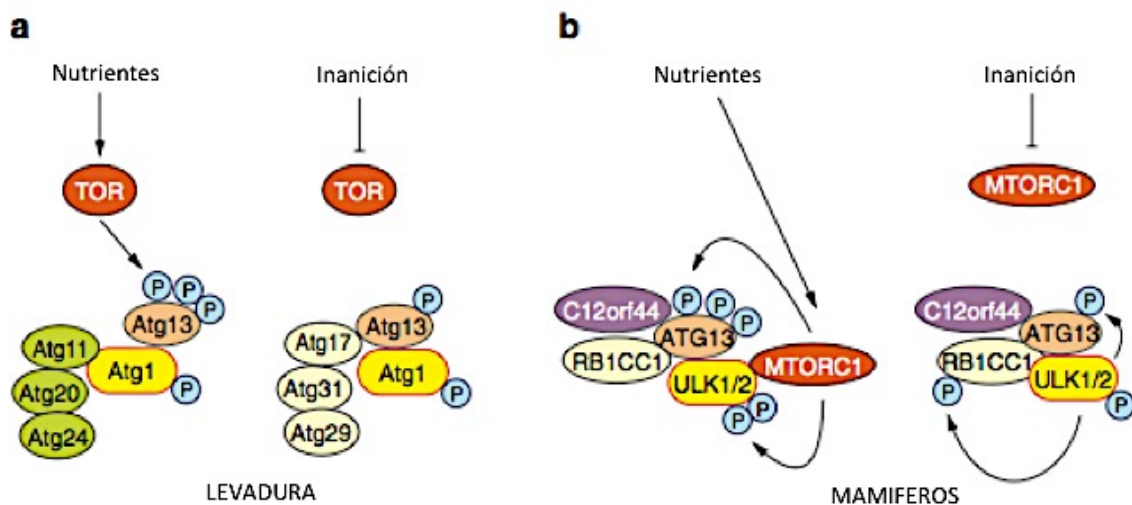


Figura 8. Regulación del complejo Atg1 en levadura y el complejo ULK1/2 en mamíferos. (a) El complejo Atg1 en levaduras. En levaduras, Atg1 puede formar un complejo con diferentes componentes dependiendo de la condición de nutrientes. En condiciones ricas de nutrientes TOR fosforila a Atg13, y Atg1 forma un complejo con Atg11-20-24 para funcionar en la vía Cvt. En condiciones de inanición, TOR se encuentra inactiva, Atg13 es parcialmente desfosforilada y Atg1 forma un complejo con A17-Atg31-Atg29 para inducir autofagia. (b) El complejo ULK1/2 en mamíferos. En las células de mamíferos, Atg13 forma un complejo con ULK1/2. En condiciones

ricas de nutrientes, el complejo mecánico de TOR 1 (MTORC1) también se une al complejo ULK1/2 y fosforila Atg13 y ULK1/2. En condiciones de inanición la actividad de MTORC1 es inhibida y se disocia del complejo ULK1/2. El complejo ULK1/ es activado y fosforila a Atg14 y RB1CC1, el homólogo funcional en mamíferos de Atg17 en levaduras (Tomado y modificado de Jin, M., 2013).

Una de las funciones de Atg17 es prevenir la asociación entre Atg1 y Atg13 en condiciones ricas de nutrientes. La interacción entre Atg1 y atg17 es mediada por Atg13, (aunque Atg17 es capaz de unirse a Atg1 en ausencia de Atg13), es posible que estructuralmente Atg17 contiene un sitio de unión a Atg1 e interactúe directamente con Atg1. La interacción entre Atg17 y Atg13 se ve potenciada por rapamicina, y no es dependiente de Atg1. Por otro lado, el estado de fosforilación de Atg13 es controlado por Tor, y regula la asociación entre Atg13 y Atg1. Es posible que Atg17 tenga una mayor afinidad por la Atg13 desfosforilada que por la forma hiperfosforilada de Atg13. Por lo que es probable que Atg17 sea otro blanco de la señalización de Tor, y un blanco interesante en diversos procesos relacionados con el metabolismo tales como el envejecimiento (Kabeya, Y., 2005).

- **Atg18**

Las proteínas Atg primero se encargan de mediar la biogénesis del fagoforo y posteriormente su expansión a autofagosoma a través de la adquisición de lípidos de la bicapa lipídica. Un evento importante durante este proceso es la generación de la PI3P en el PAS por el complejo PI3PK, el cual es un regulador clave del proceso de autofagia para el reclutamiento de la maquinaria de autofagia. Atg18 tiene la característica de conterner en su estructura 7 repeticiones del dominio WD40, el cual consta de 40 aminoácidos que terminan en triptofano y aspartato plegados en una estructura de 7 hojas β plegadas, la cual sirve como andamio y promueve y/o coordina el ensamble de complejos proteicos por la creación de un puente estable para la interacción estable y reversible proteína-proteína. La interacción de Atg18 con los fosfoinositidos es especial para su localización hacia el PAS, los endosomas y las vaculas, se encarga de regular los niveles de PIP3P y su actividad depende de la proteína Atg2. Atg18 se ha identificado específicamente en *S. pombe* y se ha descrito que la proteína Atg18a

una vez que forma un complejo con Atg2 puede contribuir a los cambios en la localización de la fosfatidil inositol 3-cinasa al unirse a ésta lo cual es importante para localizarla en sitio de ensamble del fagoforo y así cumplir su función en la formación de los autofagosomas, en *S. pombe* se han identificado 3 genes para Atg18 los cuales son ATG18a, ATG18b y ATG18c, donde el análisis de la delección de cualquiera de éstos tres revela que todos son esenciales para completar la degradación autofágica, donde además Atg18a se ha identificado que es requerida específicamente para el direccionamiento del complejo Atg12-Atg5-Atg16 (Sun, LL., 2013; Mukaiyama, H., 2010; Rieter, E., 2013). Por lo que consideramos esencial su estudio durante el envejecimiento debido a su importancia en el proceso de autofagia.

2.4.3. Regulación del proceso de autofagia

- Reguladores rio arriba de autofagia.

El regulador clave de la autofagia la cinasa TOR, actúa a nivel de complejo de iniciación Atg1, esta cinasa es capaz de regular el crecimiento celular, la proliferación, supervivencia, la síntesis de proteínas y la autofagia. La actividad de TOR puede ser modulada por cambios en la abundancia de aminoácidos por la interacción con GTPasas tipo RAG, las cuales se encuentran en la superficie del lisosoma; en condiciones de elevadas concentraciones de aminoácidos se promueve la activación de un complejo regulador y la subsecuente activación las RAG GTPasas, las cuales reclutan a TOR hacia la membrana del lisosoma donde es activada por la RHEB GTPasa y la inactivación del complejo de iniciación de autofagia. Los niveles de energía intracelular también regulan la autofagia vía AMPK, y tienen la capacidad de activar directamente el complejo Atg1, por las cascadas de cinasas en respuesta a los niveles de AMP, los cuales inducen la actividad de la cascada de cinasas, y cambios en la concentración de Ca^{+2} los cuales inducen la activación del complejo Atg1. AMPK también puede influenciar la autofagia por inhibición de TOR mediante la fosforilación de la subunidad rapTOR o la inhibición de la subunidad TSC (Lapierre, LR. 2015).

- Regulación transcripcional de la autofagia

La autofagia se incrementa en diversos organismos modelos con un fenotipo de longevidad aumentada. Algunos factores de transcripción conservados, particularmente TFEB y FOXO controlan la expresión de muchos genes relacionados con la autofagia y son importantes para la extensión de la esperanza de vida (Lapierre, LR. 2015).

- Factores de transcripción asociados a MIFT o TFEB

Además del papel de TOR en la autofagia, la cinasa TOR también se encarga de fosforilar factores de transcripción con roles en la autofagia, lo cual impide que éstos se trasloquen al núcleo y cumplan con su función. Entre ellos se encuentra TFEB, miembro de la familia MIFT (factores de transcripción asociados a microftalmia), éste factor de transcripción se asocia con la biogénesis lisosomal y regulación de genes involucrados en la formación de autofagosomas (Atg9, Atg18 y Atg8), reconocimiento del cargo (Sqstm1), fusión vacuolar (Vps11 y Vps18), bombeo de protones vacuolar (subunidades de la V-ATPasa), y degradación lisosomal (sulfatasas y catepsinas) (Pietracola, F., 2013; Settembre, C., 2011).

- Factores de transcripción Forkhead (FOXO)

Los factores de transcripción FOXO juegan un rol importante en la homeostasis celular a través de la regulación de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y glucosa y en la función mitocondrial. El rol de factor de transcripción FOXO en el proceso de autofagia se ha descrito en modelos murinos, en el músculo FOXO1 y FOXO3 elevan el flujo autofágico incrementando la expresión de genes de la maquinaria de autofagia (Atg1, VPS34, Atg6, Atg4, Atg8 y Atg12) y de la degradación de proteínas vía proteosomal. Particularmente, FOXO3 incrementa la capacidad del lisosoma para degradar el cargo. Interesantemente, AMPK activa miembros de la familia FOXO en células de mamífero para promover la degradación proteica y la producción de energía a partir de fuentes alternativas (Zao, J., 2007; Lapierre, LR., 2015)

- Complejo Ume6

Ume6 es parte de un complejo que incluye al correpresor Sin3 y la desacetilasa de histonas Rpd3, el cual actúa como un regulador negativo de la transcripción de Atg8. La delección de cualquiera de los componentes del complejo permite un incremento de Atg8 y por ende, de la actividad de autofagia.

Existen otros factores de transcripción involucrados en la modulación de la autofagia tales como NFkB, que es capaz de regular la actividad de TOR; TP53, que se involucra con diferentes tipos de cáncer, es capaz de modular la autofagia por medio de AMPK o inhibiendo TOR, la actividad de éste depende de su localización; en el núcleo actúa como factor de transcripción para los genes ATG2, ATG4, ATG7 y ATG10, y en citosol es capaz de inhibir la autofagia; por otro lado, Pho23 que puede de controlar negativamente la expresión de proteínas de autofagia como Atg1, Atg7, Atg8, Atg9 y Atg14 (Feng, Y., 2015).

3. MARCO DE REFERENCIA

El envejecimiento cronológico en *S. pombe* ha sido caracterizado por diferentes técnicas, particularmente se ha observado que con el método de floxina B, el 82% de la población muere en el día 20, mientras que con la técnica de UFC el 99% la población pierde la viabilidad al día 20 (**Figura 9**) (Roux, AE., 2006). De acuerdo con estos datos, se estableció como ventana de estudio del envejecimiento en *S. pombe*, entre los días 2 y 18, se midieron los niveles de ARNm de genes de autofagia y proteasas utilizando como control de células jóvenes con 2 días de cultivo, se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de ARNm donde los principales cambios se encontraron en los genes ATG4, ATG14 y ATG17 entre los días 6 y 15, mientras que en el caso particular de los genes codificantes para las proteasas FMA1, FMA2 e ICP55, se observaron aumentos significativos al día 8 y 12; sin embargo, los niveles de ARNm son bajos debido a que éstos genes son de baja expresión y se hizo la comparación con un gen de alta expresión como β -actina, por lo que es necesario hacer el análisis con uno de baja expresión (**Figura 10**) (Segundo, PL., 2015; Lancho, D., 2015).

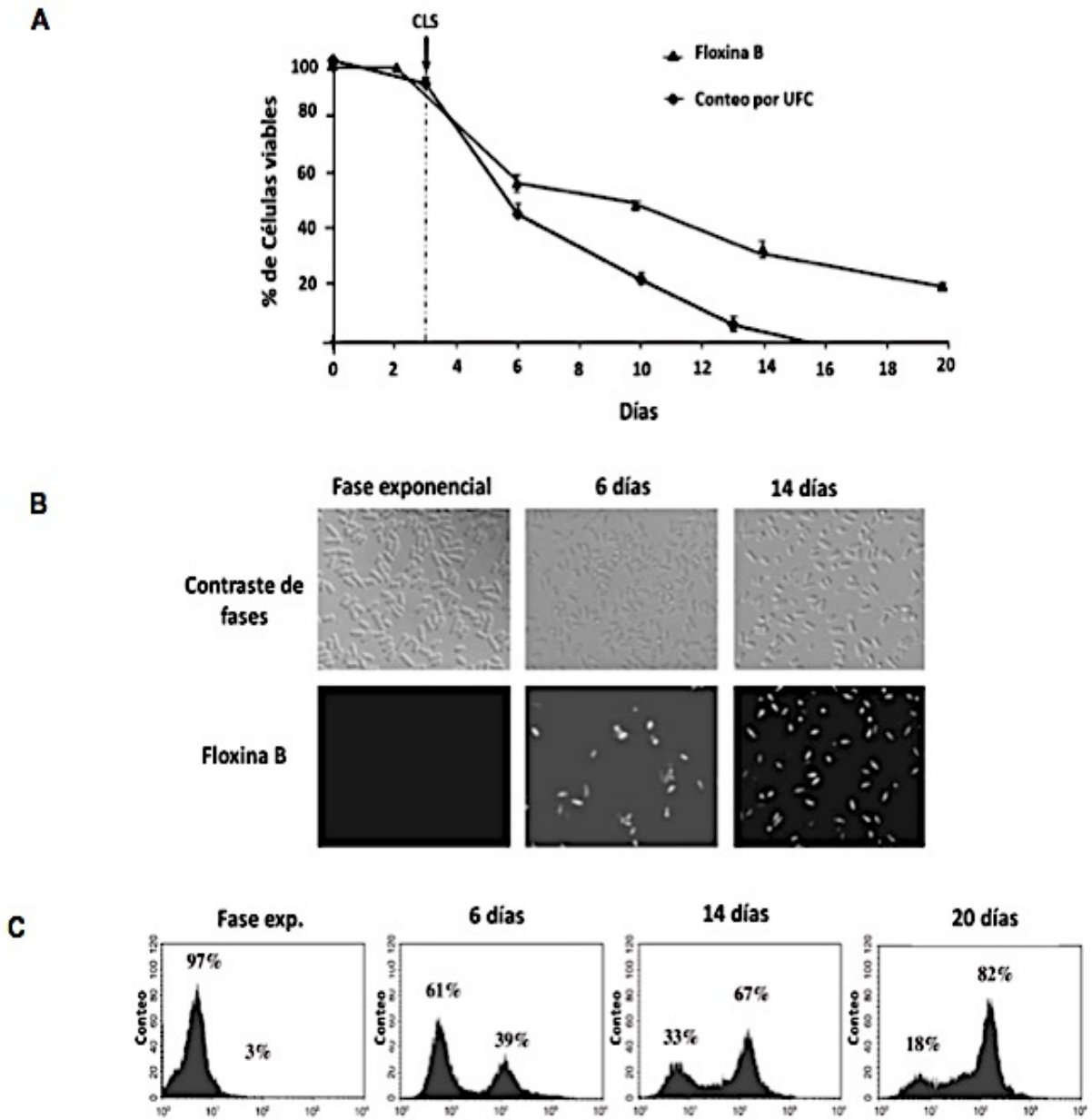


Figura 9. Envejecimiento cronológico de *S. pombe*. (A) Curvas de supervivencia de *S. pombe* estimado por recuento de UFC y con el colorante vital floxina B, la flecha indica el día en que comienza el CLS. (B) Fotomicrografías de células positivas a floxina B. (C) Porcentaje de células vivas medido como el número de células no teñidas con floxina B (pico de la izquierda) vs células teñidas (pico derecho) durante la fase estacionaria (Tomado y modificado de Roux, AE., 2006).

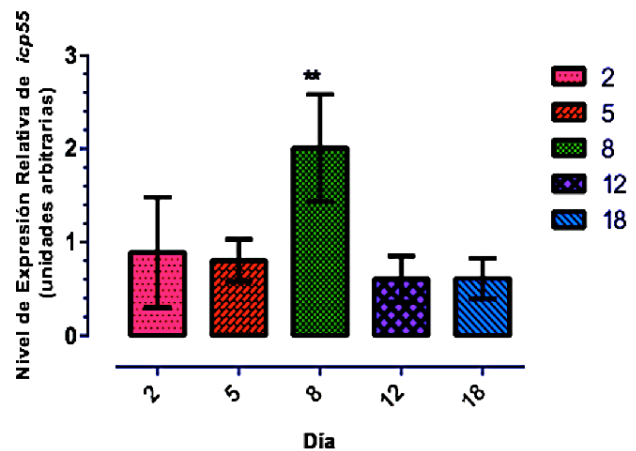
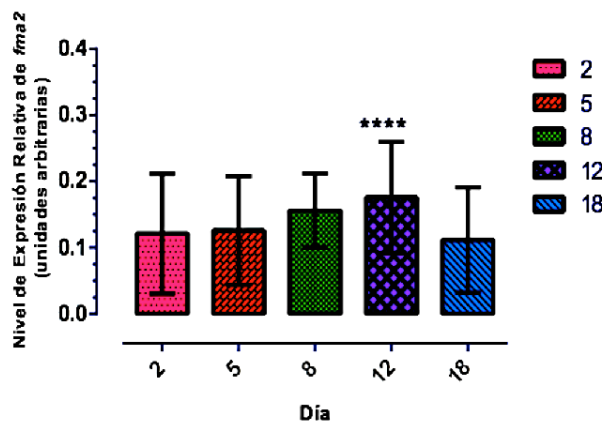
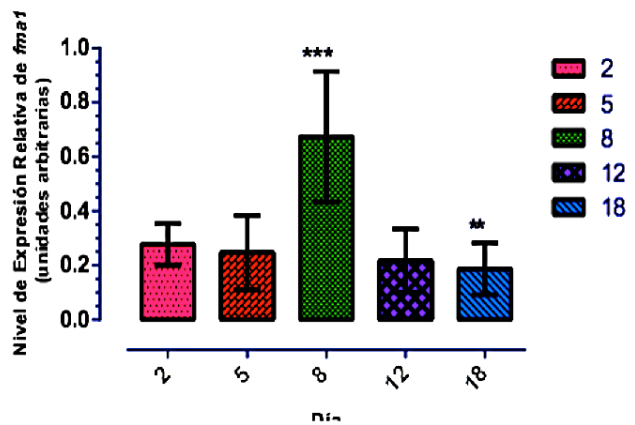
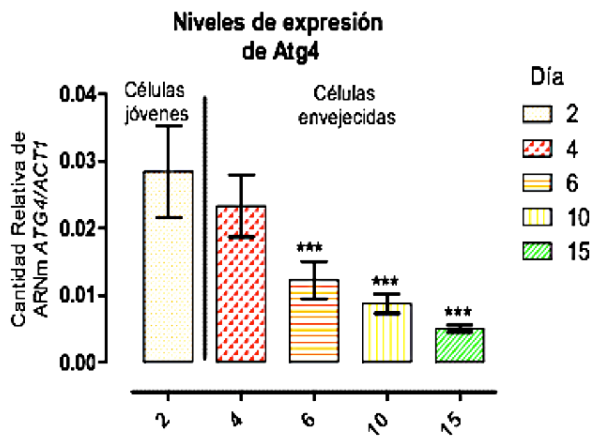
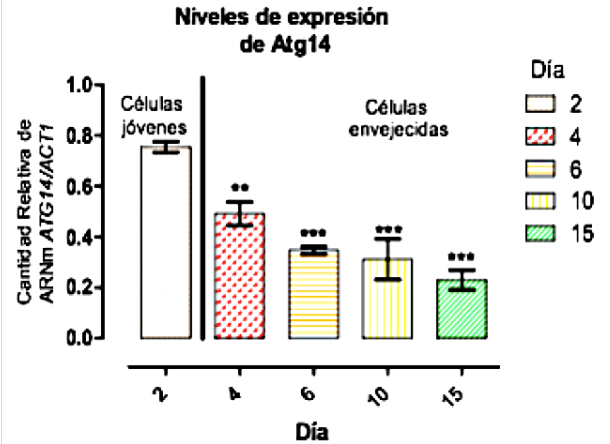
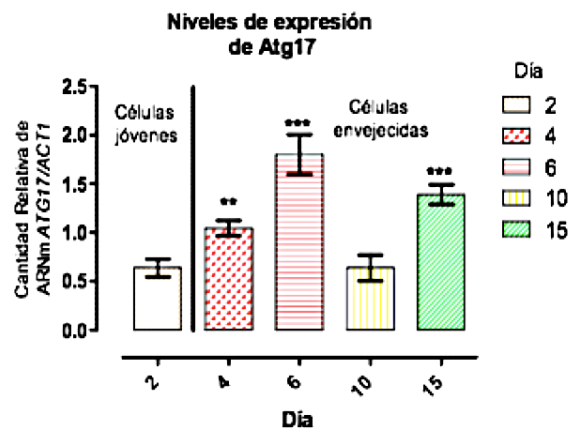


Figura 10. Niveles de ARNm de genes de autofagia y proteasas en condiciones de envejecimiento cronológico de *S. pombe*. Se pueden observar diferencias significativas desde los 4 días envejecimiento, siendo más notorias después de los días 6 y 8 de envejecimiento cronológico. (Tomado de Segundo, PL., 2015 y Lancho, D. 2015).

La relación de genes de autofagia con el envejecimiento cronológico en levaduras ha sido expuesto; en *S. cerevisiae*, se han generado mutantes donde se ha deletado ATG4, ATG17 o ATG18 en combinación con la delección del gen Arv (proteína del retículo endoplásmico que promueve la autofagia durante el envejecimiento cronológico) en la que se incrementa la esperanza de vida de la levadura (Garay, E., 2014). El estudio de los genes de autofagia individualmente es importante para el mejor entendimiento tanto del proceso de autofagia así como de su función durante el proceso de envejecimiento.

Para conocer el papel de un gen en la levadura, se ha trabajado con la interrupción de genes por recombinación homóloga, el cual ha permitido el análisis genético molecular basado en la eliminación o inactivación de un gen específico. La construcción de un cassette interruptor, tiene como fundamento la recombinación homóloga donde dos cadenas similares o idénticas de ADN son intercambiadas y finalmente es capaz de producir variabilidad genética. Por lo que para hacer el diseño de éstos cassettes interruptores es necesario tener regiones homólogas 5' y 3' del locus de destino que flanquean un gen marcador de selección cuya eficiencia es dependiente mayormente del tamaño de ésta región. La construcción debe ser incorporada por transformación y haciendo uso de la maquinaria de recombinación de la levadura, el cassette se dirige hacia el locus específico y es capaz de eliminar el fragmento correspondiente al gen e incorporar el gen de marcador de selección (Wendland, 2003). Para la construcción es necesario amplificar las regiones homólogas al gen blanco con una longitud de > 250 pb, para lograr una eficiencia de integración alta y se debe utilizar un gen marcador de selección, que demuestre una alta y eficiente integración en el genoma de cepas con las auxotrofías específicas para la selección de las colonias transformantes (Krawchuk, M., 1999; Keeney, JB., 1994).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el envejecimiento cronológico es esencial la autofagia y para su funcionamiento proteínas como Atg4, Atg17 y Atg18 son esenciales, se ha observado que los niveles de expresión del transcrito de éstas cambia durante el envejecimiento cronológico; sin embargo, aún no se conoce el papel de éstas durante el proceso, por lo que es necesario caracterizarlas para definir su participación en la autofagia durante el envejecimiento.

5. JUSTIFICACIÓN

Las proyecciones de la CONAPO muestran que en las próximas décadas la población en México se encontrará en proceso de envejecimiento demográfico, caracterizado por la pérdida de la clásica pirámide poblacional, teniendo a la mayor parte de la población con un promedio de edad alrededor de los 60 años, lo cual se asociará con un aumento de casos de enfermedades asociadas con la edad y por ende un aumento en la demanda de servicios de salud. Elucidar los procesos celulares relacionados con el envejecimiento como la autofagia se ha convertido en una necesidad, por lo que en el presente trabajo se investigará el papel que tienen proteínas clave como Atg4, Atg17 y Atg18a del proceso de autofagia, durante el envejecimiento, las cuales podrían dar un panorama del impacto de estos procesos en el modelo de envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe*.

6. HIPÓTESIS

Durante el envejecimiento cronológico de *S. pombe*, la expresión de las proteínas Atg4, Atg17 y Atg18a cambia, alterando la eficiencia del proceso de autofagia.

6.1 Hipótesis nula

Durante el envejecimiento cronológico de *S. pombe*, la expresión de las proteínas Atg4, Atg17 y Atg18a no cambia.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Determinar los niveles de ARNm de los genes *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a* en condiciones de envejecimiento cronológico y hacer la construcción de los cassettes de interrupción para el reemplazo génico de los genes *ATG4* y *ATG17* de *S. pombe*.

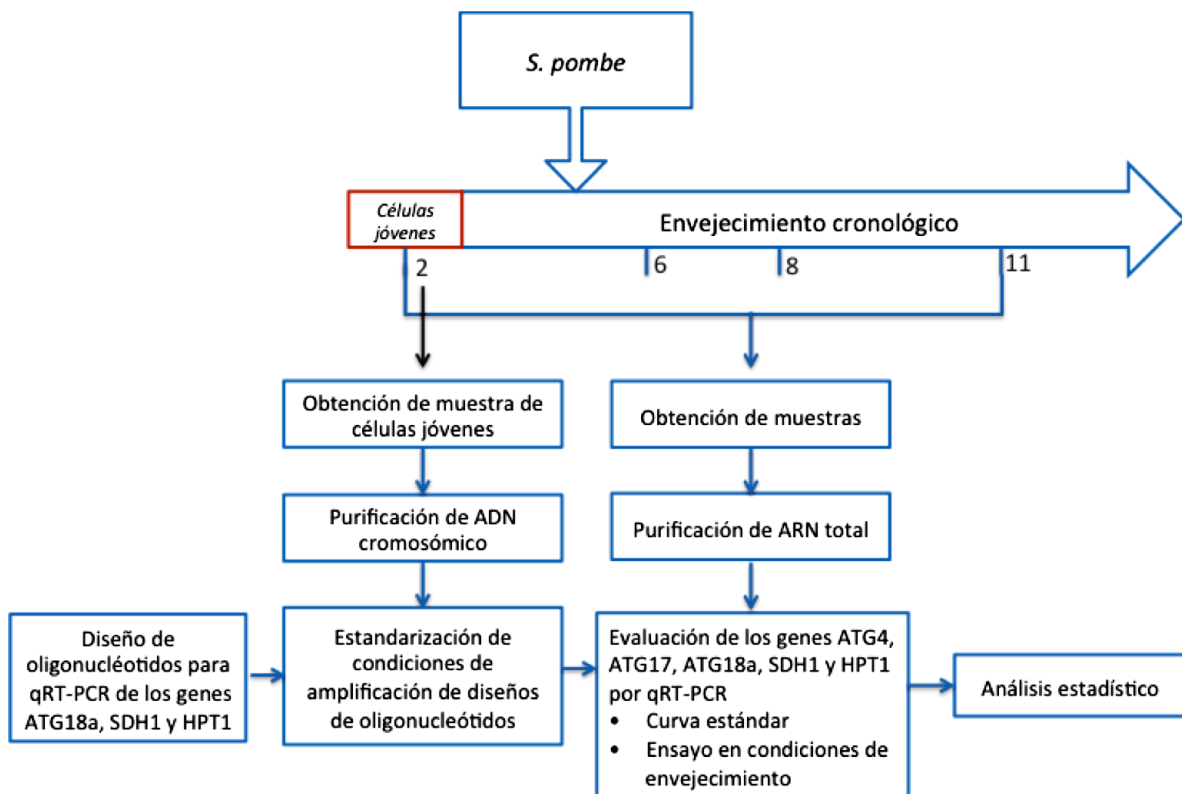
7.2. Objetivos particulares

- Determinar el nivel de ARNm para los genes *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a*, en condiciones de envejecimiento cronológico en *S. pombe*.
- Construcción del cassette de interrupción de los genes *ATG4* y *ATG17* de *S. pombe*.

8. METODOLOGÍA

8.1. Determinación de los niveles de ARNm de los genes *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a*

Para cumplir con el objetivo de determinar los niveles de ARNm de los genes *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a* en condiciones de envejecimiento cronológico se diseñó el siguiente diagrama de trabajo:



8.1.1. Cultivo y envejecimiento cronológico de *S. pombe*

Las cepas utilizadas en esta parte del trabajo se describen en la **tabla 1**, la composición de los medios de cultivo utilizados son el Yeast Extract (YE) con 2% o 3% de glucosa y Medio Mínimo de Endimburgo (EMM) (Anexo 1).

Cepa	Genotipo	Procedencia
<i>S. pombe</i> 972	<i>h</i> ⁺	ATCC
<i>S. pombe</i> 826	<i>h</i> ⁺ / <i>h</i> ⁺ <i>leu1-32/leu1-32, ade6-M210/ade6-M250, ura4-D18/ura4-D18</i>	ATCC

Las cepas 972 y 826 de *S. pombe* se hicieron crecer a partir de un cultivo permanente almacenado a –80 °C, sembrando un precultivo en 5 ml de medio de cultivo líquido estéril YE con 3% de glucosa, el cual se incubó por 48 horas a 29 °C con agitación constante (200 rpm); se tomó una alícuota para sembrar por estría en una placa con medio YE y se dejó incubando 4 días a 29 °C hasta el crecimiento de colonias, con las que se realizaron los experimentos del presente trabajo.

Para obtener a *S. pombe* 972 en condiciones de envejecimiento cronológico se comenzó preparando un precultivo de 5 mL en medio líquido YE, se incubó a 29 °C durante 24 horas, a partir del precultivo se prepararon tres cultivos controlados en el Medio Mínimo de Endimburgo (EMM) de la siguiente manera:

- Se midió la densidad óptica del precultivo a una $\lambda=600$ nm, haciendo una dilución 1:10 con H₂O en un volumen final de 1 mL.
- Utilizando la **ecuación 1** se obtuvo el volumen necesario de precultivo para preparar un cultivo de 10 mL.
- Se prepararon 3 cultivos y se dejaron incubando por 2, 6 y 8 días a 29 °C con agitación constante (200 rpm).
- Se obtuvieron los paquetes celulares a los 2, 6 y 8 días y se hizo la purificación de ARN total (el cultivo de 10 mL fue dividido en 3 alícuotas iguales, las cuales fueron utilizadas para la purificación de ARN total).

Ecuación 1. Cálculo del volumen requerido de precultivo de *S. pombe* para generar un cultivo en restricción calórica

$$\frac{[(Y)(0.4)]/2^n}{OD * fd}$$

Donde:

- *OD* = densidad óptica
- *fd* = factor de dilución
- *Y* = volumen final del cultivo
- *n* = número de generaciones que se espera en el cultivo

Debido a los requerimientos de la cepa de *S. pombe* 826 fue necesario hacer el cultivo en medio líquido YE con 2% de glucosa (YE 2%) adicionando los requerimientos auxotróficos correspondientes. Al igual que en la cepa de *S. pombe* 972 se inició con un precultivo en medio líquido YE con 3% de glucosa (YE 3%) incubando a 29 °C con agitación constante por 48 horas, posteriormente se midió la densidad óptica y utilizando la **ecuación 1** se hizo el cálculo para conocer el volumen necesario para hacer los cultivos en condiciones de envejecimiento cronológico, los cultivos se hicieron en este caso en medio YE 2% con los componentes auxotróficos correspondientes en un volumen de 10 mL se incubaron a 29 °C con agitación constante y posteriormente se obtuvieron los paquetes celulares a los 2, 5, 8 y 11 días de cultivo.

8.1.2. Diseño de oligonucleótidos para qPCR

Para las reacciones de RT-PCR y PCR se diseñaron oligonucleótidos usando la secuencia nucleotídica de los ARNm *SDH1*, *HPT1* y *ATG18a*, de *S. pombe* obtenida de la base de datos GenBank (Tabla 2), a partir de ésta se hizo el diseño de oligonucleótidos utilizando el programa IDT Oligo Analyzer del dominio IDT disponible en www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/. Los oligonucleótidos para el análisis de los genes *ATG4* y *ATG17* fueron diseñados en un trabajo previo (Segundo, PL., 2015). El diseño tiene las características señaladas en la **tabla 3**:

Tabla 2. Genes utilizados (Base datos GenBank)				
Gen	Cromosoma	Gen ID	Clave	Producto
<i>SDH1</i>	I	2541690	SPAC1556.02c	Succinato deshidrogenasa
<i>HPT1</i>	I	2541970	SPAC23C11.13c	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
<i>ATG18a</i>	I	2542180	SPAC589.07c	Proteína involucrada en la autofagia Atg18a
<i>ATG4</i>	I	2542182	SPAC19B12.08	Deconjugador de Atg8, Atg4
<i>ATG17</i>	I	2543011	SPAC10F6.11c	Protein cinasa activadora relacionada a la autofagia Atg17

Tamaño del amplicón	100-150 pares de bases
Longitud del oligonucleótido	20-27 pares de bases
T _m	56-62 °C
%GC	50-55%
Formación de heterodímeros	Nula en temperaturas de amplificación
Formación de horquillas	Nula en temperaturas de amplificación
BLAST	≈0 con respecto al gen y >1 respecto a otros ARNm

8.1.3. Purificación de ADN cromosómico de *S. pombe*

La purificación se hizo con el kit Wizard sv Genomic DNA Purification System considerando el siguiente protocolo:

- Se tomó una alícuota de células *S. pombe* cepa 972 h⁻ de 2 días de cultivo en EMM, se obtuvo el paquete celular centrifugando a 8000 rpm por 3 minutos. Se lavó con agua estéril desmineralizada y desionizada y se eliminó el sobrenadante.
- Se realizó una disrupción enzimática de la pared celular con 0.2 mg de Zimoliasa 20T, solubilizada en 60 µL de buffer de Zimoliasa, a 37 °C durante 45 min, homogenizando cada 10 minutos. Se centrifugó a 8000 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se añadieron 250 µL de buffer de lisis SV Wizard y se mezcló por pipeteo.
- Se montó el sistema de mini columna SV Wizard para el lisado, el cual consiste en una mini columna SV Wizard dentro de un tubo colector.
- Se transfirió el lisado al sistema de mini columna cuidando de no picar la columna, se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 13,000 g por 3 minutos.
- Se descartó el filtrado, se volvió a ensamblar la columna y posteriormente se añadieron 650 µL de solución de lavado Column Wash Solution y se centrifugó a 13,000 g por un minuto. Posteriormente se descartó el filtrado y se repitió este paso 3 veces.
- Se centrifugó a 13,000 g por 2 minutos para eliminar el etanol residual y se pasó la columna SV Wizard a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo, se

añadieron 40 μ L de agua libre de nucleasas previamente calentada a 65 °C y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente.

- Se centrifugó a 13,000 g por 2 minutos y al filtrado se etiquetó como 1ra elución de ADN cromosómico.
- Se hizo una segunda elución con 30 μ L y se etiquetó como 2da elución.
- Se agregó a cada elución 1 μ L de Rnasa y se incubó por 30 minutos.
- Se confirmó la purificación por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % con buffer TBE al 0.5 X corriendo a 100 V por 30 minutos.
- Se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

8.1.4. Purificación de ARN total de *S. pombe*

- Se tomó una alícuota de 3 mL de células de *S. pombe* en condiciones de envejecimiento cronológico, se obtuvo el paquete celular centrifugando a 8000 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavó con agua estéril desmineralizada y desionizada y se eliminó el sobrenadante.
- Se realizó una disrupción enzimática de la pared celular con 0.2 mg de Zimoliasa 20T, solubilizada en 60 μ L de buffer de Zimoliasa, a 37 °C durante 45 min. Antes de proceder a la extracción se tomó una alícuota de 5 μ L y se observó al microscopio para verificar la morfología celular. Se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos.
- Se agregaron 350 μ L de TRIzol y se resuspendió cuidadosamente hasta observar un cambio en la consistencia de la mezcla. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio donde se le agregaron 80 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 30 segundos, posteriormente se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C.
- Se tomó la fase acuosa y pasó a un tubo limpio, teniendo cuidado de no tomar residuos de las otras dos fases. Se agregó un volumen de

isopropanol frío por cada volumen de fase acuosa y se mezcló cuidadosamente, se incubó a temperatura ambiente por 10 min, centrifugándose a 12000 g por 10 minutos a 4 °C.

- Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 350 µL de etanol frío al 75%, centrifugándose a 7000 g durante 10 minutos a 4 °C.
- Se eliminó el etanol y se permitió la evaporación de residuos del mismo, para posteriormente agregar 50 µL de H₂O libre de nucleasas.
- Para eliminar las estructuras secundarias del ARN, se sometió a una incubación a 55 °C por 5 minutos. Inmediatamente después el tubo se pasó a hielo para cuidar el ARN de una posible degradación. Se dividió la cantidad total de ARN obtenido en alícuotas pequeñas.
- Finalmente se almacenó a -80 °C.
- Una de las alícuotas fue utilizada para la cuantificación por espectrofotometría de la cantidad de ARN obtenido utilizando NanoDrop y para corroborar la integridad del ARN por se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en TBE 0.5X corriendo a 100 V por 30 minutos.

8.1.5. Reacción de PCR en punto final

Para los ensayos de PCR se usó como plantilla ADN cromosómico de *S. pombe* 972 usando el kit de PCR Phusion High-Fidelity siguiendo los protocolos descritos en las **tablas 4 y 5**.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación del fragmento del gen por PCR de punto final	
Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 5x Phusion HF	2
DMSO	0.2
dNTPs 10 mM	0.2
Mg ⁺²	0.2
ADN _{polimerasa}	0.1
ADN (100 ng/µL)	1
H ₂ O	5.3
Primer sentido (10 pmol/µL)	0.5
Primer antisentido (10 pmol/µL)	0.5

Tabla 5. Condiciones de reacción para la amplificación de un fragmento de cada gen por PCR de punto final			
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre-desnaturalización	98	30 seg	1
Desnaturalización	98	10 seg	35
Alineamiento	60	30 seg	
Polimerización	72	30 seg	
Extensión final	72	5 min	1

La verificación se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TBE al 0.5 X y se corrieron a 100 V por 30 minutos.

8.1.6. Reacciones de qRT-PCR en tiempo real

La qRT-PCR (RT-PCR en tiempo real) para medir los niveles de los transcritos de *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a* se realizó siguiendo los siguientes protocolos:

8.1.6.1. Generación de curvas estándar de amplificación

Para la generación de curvas estándar se utilizó como plantilla ARN total de dos 2 días previamente cuantificado, para cada reacción inicialmente se hizo un tratamiento con DNasa para evitar falsos positivos por contaminación con ADN. El ensayo con DNasa se hizo con las condiciones descritas en la **tabla 6**. Posteriormente se continuó con la generación de ADN complementario (ADNc) por retrotranscripción utilizando oligo dT el cual hibrida en la cola poli A de los ARNm y sirve como iniciador para la retrotranscriptasa, las condiciones se especifican en la **tabla 7**.

Tabla 6. Mezcla de reacción para el tratamiento con DNasa del ARN total y condiciones de incubación.	
Reactivo	Volumen µL
DNasa	1
Buffer DNasa	0.5
ARN (500 ng/µL)	1
H ₂ O	1.5 (cbp. 5)
<i>Incubación a 37 °C por 30 minutos</i>	
EDTA	1
<i>Incubación a 65 °C por 10 minutos</i>	

Tabla 7. Mezcla de reacción para la reacción retrotranscripción y condiciones de temperatura para el termociclador para generar curvas estándar. La mezcla contiene la concentración necesaria para un triplicado para cada gen.

Reactivo	Volumen (μL)
ARN (tratado con DNAsa, 100 ng/ μL)	5
Oligo (dT) primer	0.2
Buffer de Reacción 5X	2
Ribolock RNasa Inhibitor	0.2
dNTP Mix	1
RevertAid M-MuLVmReverse Transcriptase	0.2
H ₂ O	1.4 (cbp. 10)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
42	60
70	5

Una vez concluida la reacción de retrotranscripción se hizo la dilución necesaria para tener 10 ng/ μL (dilución 15) y se prepararon las mezclas de reacción de acuerdo con la **tabla 8**, utilizando una concentración desde 20 hasta 1.25 ng utilizando el factor de dilución 1:2. Una vez mezclado se deposita en la placa y se programa el equipo para la generación de una curva estándar agregando una curva de melting con el protocolo descrito en la **tabla 9**.

Tabla 8. Mezclas de reacción para la generación de curvas estándar para qPCR por el método de cuantificación relativa.

cDNA (ng)	Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (μL)	Primer sentido (10 pmol/ μL) (μL)	Primer antisentido (10 pmol/ μL) (μL)	ADNc (10 ng/ μL) (μL)	H ₂ O (μL)
20	15	1.5	1.5	6	6
10	15	1.5	1.5	3	9
5	15	1.5	1.5	1.5	10.5
2.5	15	1.5	1.5	0.75	11.25
1.25	15	1.5	1.5	0.375	11.625

** Cada mezcla de reacción tiene el volumen necesario para hacer un triplicado*

Tabla 9. Condiciones de reacción para la amplificación de ARNm por qRT-PCR para la generación de curvas estándar con curva de Melting			
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre-desnaturalización	95	10 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	40
Alineamiento	*60	30 seg	
Polimerización	72	30 seg	
Curva de Melting			
	95	15 seg	1
	60 +0.3	60 seg	
	95	15 seg	
<i>* Ciclo en cual el equipo hace lectura de la intensidad de fluorescencia</i>			

Una vez concluida la reacción se hizo la construcción de las curvas estándar graficando el logaritmo de la concentración contra el Ct promedio de cada reacción, posteriormente se hizo la regresión lineal de los datos para obtener la ecuación de la recta y el valor de R, se aplicó el método de cuantificación relativa a la curva estándar.

8.6.1.2. qRT-PCR con cuantificación relativa a la curva estándar o cuantificación por el método de $\Delta\Delta Ct$

La obtención de los niveles de transcripción de cada gen en condiciones de envejecimiento cronológico, se realizó bajo el siguiente protocolo:

- Se hizo el tratamiento con DNAsa a cada muestra de ARN de los diferentes días de envejecimiento de acuerdo con la **tabla 6**.
- La retrotranscripción se hizo de acuerdo con la **tabla 7**, para cada uno de los ARN de los diferentes días y una vez concluida se hizo una dilución 1:5 del ADNc generado para obtener la concentración final de 10 ng/ μ L.
- Se hizo la mezcla de reacción para la qPCR utilizando el ADNc de cada día de acuerdo con la condición de reacción correspondiente a la cantidad de 10 ng por reacción descrita en la **tabla 8**, las temperaturas con las cuales se efectuó el corrimiento fueron las descritas en la **tabla 9** (omitiendo la

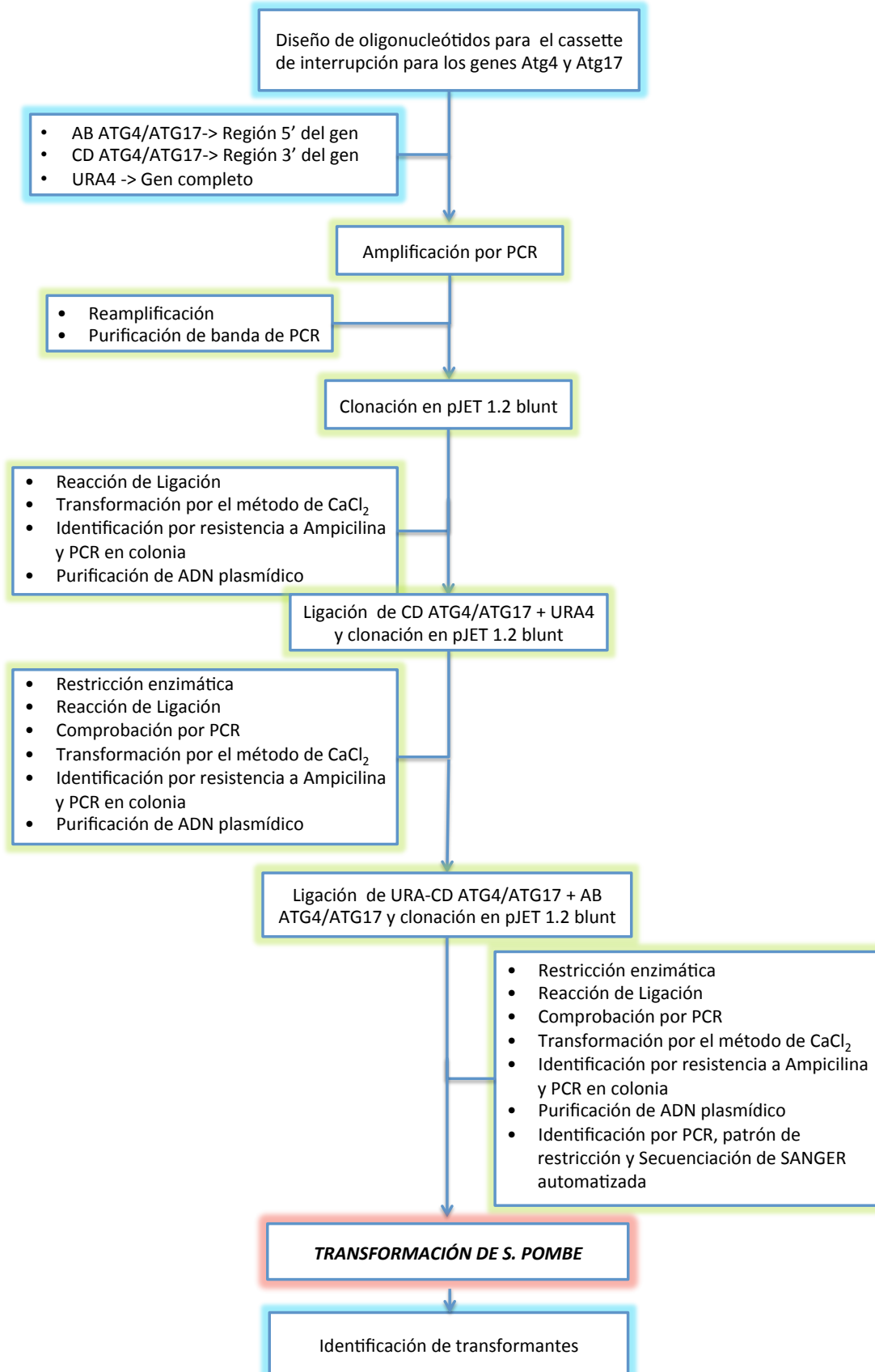
curva de melting debido a que se estandarizaron las condiciones de amplificación previamente).

- Una vez finalizado el ensayo, los resultados fueron exportados al programa Excel, en el cual se hicieron los cálculos necesarios para la extrapolación de los resultados obtenidos (se realizaron tres experimentos independientes por triplicado) con su correspondiente curva estándar.
- Para la obtención de los resultados utilizando el método de cuantificación relativa a la curva estándar, primero se hizo el cálculo de la concentración de ARNm en cada condición para cada día de envejecimiento utilizando el valor obtenido de Ct arrojado por el equipo extrapolándolo utilizando la ecuación de la recta de la curva estándar correspondiente, posteriormente se hizo el cálculo de la razón de cada una de las concentraciones de ARNm dividiéndola entre la concentración de ARNm de su correspondiente control endógeno, siendo *SDH1* el control endógeno para cada uno de los ARNm. Una vez calculadas las razones de la concentración para cada gen, estas fueron graficadas en el programa GraphPad Prism 5, donde se hizo el análisis estadístico correspondiente a ANOVA de una vía, utilizando el test de mediciones repetidas, con el test posterior de Dunnett donde se hace la comparación de diferentes tratamientos con un solo control, utilizando como control día 2 (células jóvenes). Se hizo el triplicado de cada reacción en cada uno de los ensayos y cada ensayo se hizo por triplicado.
- El método del $\Delta\Delta Ct$ es un modelo que calcula los cambios de expresión en relación a la diferencia entre el gen de interés y el gen endógeno, utilizando la ecuación $RQ = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ siendo $\Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{gen\ endógeno})$ y $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{condición\ problema} - Ct_{condición\ control})$, siendo la condición problema los días de envejecimiento y la condición control el día 2 de células jóvenes. Una vez una vez obtenidos los resultados de cada gen en cada condición se graficaron los valores de RQ utilizando el programa GraphPad Prism 5, donde se hizo el análisis estadístico correspondiente a ANOVA de una vía, utilizando el test de mediciones repetidas, con el test posterior de Dunnett (comparando todas las columnas contra una columna control) utilizando

como control día 2 (células jóvenes). Se hizo el triplicado de cada reacción en cada uno de los ensayos y cada ensayo se hizo por triplicado.

8.2. Construcción de plásmidos para interrupción por recombinación homóloga de los genes ATG4 y ATG17.

Para cumplir con el objetivo del reemplazo génico por recombinación homóloga de los genes ATG4 y ATG17 se diseñó el siguiente diagrama de trabajo:



8.2.1. Diseño de oligonucleótidos para la generación del cassette de interrupción de los genes *ATG4* y *ATG17*

La interrupción de un gen de interés por recombinación homóloga tiene el objetivo de obtener cepas mutantes encaminadas al análisis de un gen específico en la levadura, utiliza metodologías en las cuales se deben amplificar las regiones 5' y 3' que flanquean el gen de interés y un gen marcador de selección, que en este trabajo fue el gen *URA4*. Para el diseño se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se obtuvieron las secuencias de los genes *ATG4*, *ATG17* y *URA4* completos depositadas en GeneBank.
- Las secuencias de los genes *ATG4*, *ATG17* y *URA4* fueron analizados en el programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) para obtener el mapa de restricción y así poder elegir enzimas de restricción que no corten el gen de interés, el gen de selección ni el vector de clonación, para no tener problemas posteriores en la construcción de cassette interruptor.
- Se hizo el diseño de oligonucleótidos que amplificaran en primer lugar el gen de selección *URA4* completo, la región 5' ubicada en el promotor de los genes *ATG4* y *ATG17* nombrados AB, y la región 3' ubicado en el UTR 3' de los genes nombrado CD, utilizando el programa OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/scitools/>) tomando en cuenta los criterios para el diseño de oligonucleótidos habituales como un 50 % de GC, una Tm de 55 °C a 64 °C, nula formación de horquillas, dímeros o heterodímeros de oligonucleótidos a temperaturas de hibridación o amplificación, tomando en cuenta que la longitud mínima que hibrida con el gen de interés fuera de 20 nucleótidos, se agregó en el lado adecuado la secuencia de restricción y los nucleótidos terminales necesarios para ajustar los parámetros fisicoquímicos necesarios para una adecuada amplificación.
- Se procedió con el análisis *in silico* del cassette de interrupción haciendo la simulación de la introducción de las secuencias nucleotídicas

correspondientes a los fragmentos a clonar en el vector de clonación pJet1.2 blunt para conocer el patrón de restricción utilizando el programa NEBcutter.

- Para la construcción de los cassettes interruptores se hizo el diseño con las secuencias nucleotídicas (SPAC19B12.08, SPAC10F6.11c, SPCC330.05c), para amplificar por PCR los fragmentos correspondientes al promotor (fragmento AB) y el UTR 3' (fragmento CD) de los genes *ATG4* y *ATG17* de *S. pombe*; a los oligonucleótidos se les agregaron secuencias de enzimas de restricción compatibles para que posteriormente se pudieran ligar y tener la construcción que se muestra en la figura 10.1, las secuencias y los parámetros fisicoquímicos de los oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Secuencias nucleotídicas de los primers para la construcción de los cassettes interruptores.				
Gen	Secuencia	Tm (°C)	Longitud (pb)	% GC
ATG4 AB-S	5'- CAA GAT GCG GCC GCT ACG CAG TTT GGT ATC -3'	65.6	30	55.2
ATG4 AB-AS	5'- GCA GAC CAT AGT AGT ACT CGC AAA CTC GAG AAC GAC G -3'	65	37	51.4
ATG4 CD-S	5'- CAC TTC C CCG GG TTTC TTG AAT TCC TTC TCC ATC C -3'	64.2	34	50
ATG4 CD-AS	5'- GAT GAT TGG ACA GCA ATC TCA GGT ACC AGC AGG AC -3'	65	35	51.4
ATG17 AB-S	5'- GAT GTT BCG GCC GCT TGT ATC ATC ATC AAA GCA G -3'	65.1	34	65.1
ATG17 AB-AS	5'- GCT GTA GTT CGC AAG CTC TCA TCT CGA GTA CGA C -3'	64.6	34	52.9
ATG17 CD-S	5'- CTT CTT CCC GGG ATC ATC ATC GCT CTC CGA AGT -3'	66	33	54.5
ATG17 CD-AS	5'- AAG CAA CCA GCA TTC AAA CGG TAC CAA GGT CAC C -3'	66	34	50
URA4-NotI-S	5'- GCG GCC GCC TGG TCT TTG AAT CAT TGT CG -3'	66.5	29	58.6
URA4-KpnI-AS	5'- CTG GCA ATG TTA CGA GGA ATC TTG GGT ACC -3'	66	34	50
ATG4-S	5'- GTG ATG GAG CAA GCC TGA ACT TCA - 3'	59.5	24	50
ATG4-AS	5'- GTA GCT CAG GAA AGG GCA TTT GAG - 3'	57.8	24	50
ATG17-S	5'- ATC GAA AGA AGG TCC CAT CTG GA -3'	57.7	23	47.8
ATG17-AS	5'- CAC AAT CGG TTG AAC ATG ACC ACC - 3'	58.5	24	50

8.2.2. Amplificación por PCR de los fragmentos para la construcción del cassette de interrupción

Para la amplificación de los fragmentos AB ATG4/ATG17, CD ATG4/ATG17 y URA4, se utilizó ADN cromosómico de *S. pombe* 972, purificado con el protocolo de ADN genómico Wizard SV Genomic (Promega, Madison, WI), descrito anteriormente y se siguió la metodología siguiente para preparar los insertos y clonarlos en el vector pJET1.2 blunt:

8.2.2.1. Amplificación y reamplificación por PCR en punto final

Las reacciones de PCR se hicieron utilizando el kit de PCR Phusion High-Fidelity siguiendo los protocolos de las **tablas 4 y 5**, teniendo en cuenta que la plantilla para la amplificación es ADN cromosómico, el tiempo de extensión fue de 30 segundos por cada kb y una temperatura de alineamiento de 60 °C. Para la amplificación se hicieron reacciones de 10 µL, para la reamplificación se hicieron reacciones de 50 µL teniendo como plantilla para la reamplificación 2 µL de la reacción de amplificación previa. Las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 1 % con TBE 0.5 X por 30 minutos a 100 V, se cortó cuidadosamente la banda, se pesó y almacenó a -20 °C en un tubo eppendorf de 1.5 mL hasta su purificación.

8.2.2.2. Purificación de banda de PCR

Para clonar un fragmento de ADN, es necesario separarlo por electroforesis, se corta la banda y se prepara para poder ser clonado. Para hacer la extracción de ADN a partir del gel de agarosa, se utilizó el kit Silica Bead DNA Gel Extraction, siguiendo el protocolo del fabricante descrito a continuación:

- Una vez cortada y pesada la banda que contiene el amplicón de interés, se le agregaron 3:1 volúmenes de Binding buffer (300 µL por cada 100 mg de gel).
- Se incubó a 55 °C durante 5 minutos invirtiendo el tubo cada minuto para mezclar hasta que se disuelva por completo el gel.

- Se le agregaron 3 μ L de silica powder suspensión, se mezcló con vórtex y se incubó a 55 °C por 7 minutos mezclando con vórtex cada dos minutos.
- Se centrifugó a 12,000 g por 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- Se le agregaron 500 μ L de buffer de lavado frío, se resuspendió el pellet con vortex y se centrifugó a 12,000 g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se repitió este paso dos veces más.
- Se eliminó la mayor parte del líquido posible y se dejó secar dejando el tubo abierto, sin que el tiempo de secado exceda los 10 minutos.
- Se resuspende el pellet en 10 μ L de agua libre de nucleasas a 55 °C y se incubó a 55 °C por 8 minutos.
- Se centrifuga 12,000 g por 1 minuto y se pasa el sobrenadante a un tubo limpio (primera elución)
- Se repiten los dos últimos pasos para tener una segunda elución y finalmente se juntan en un solo tubo y se vuelve a centrifugar a 12,000 g por 1 minuto y se recupera en un tubo limpio evitando pasar residuos de silica.

8.2.3. Clonación de los fragmentos AB - ATG4/ATG17, CD – ATG4/ATG17 y URA4

Para la construcción de los fragmentos de interrupción fue necesario clonar los fragmentos por separado para tener una cantidad de ADN necesaria para hacer las reacciones de restricción y ligación posteriores.

8.2.3.1. Reacción de ligación de los fragmentos AB - ATG4/ATG17, CD – ATG4/ATG17 y URA4 con el vector de clonación pJET1.2 blunt

Se clonaron los productos de PCR utilizando el kit CloneJet PCR 1.2 blunt siguiendo las indicaciones del fabricante (**Tabla 11**)

Tabla 11. Condiciones para la ligación con el vector de clonación pJET1.2 blunt	
Buffer de reacción 2X	10 µL
Producto de PCR 8 µL	8 µL
pJET 1.2 blunt cloning vector	1 µL
T4 DNA ligasa	1 µL
* Se incubó a 22 °C por 30 minutos, 1 hora a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C por toda la noche hasta su utilización.	

8.2.3.2. Transformación de *E. coli* por el método de CaCl₂

La transformación de bacterias se hizo utilizando el protocolo modificado de Cohen y cols. 1972, utilizando la cepa de *E.coli* One Shot Top10, las cuales son bacterias de alta eficiencia de transformación (1×10^9 ufc/µg de ADN plasmídico) y propagación de plásmidos. Para hacer la transformación se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Se puso un precultivo de *E.coli* One Shot Top10 en 3 mL de cultivo de medio LB (Liuria-Bertani) a 37 °C en agitación por 16 horas.
- Se inoculó un cultivo de 3 mL de LB con 100 µL del precultivo de *E. Coli* y se incubó por 4 horas a 37 °C en agitación.
- Se tomó 1 mL de cultivo por cada muestra sumando un control positivo de transformación y se centrifugó a 8,000 rpm por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet en 200 µL de CaCl₂ 100 mM frío, y se incubó por 2 minutos en hielo.
- Se añadieron 10 µL de reacción de ligación o 2 µL (100-200 ng) de plásmido control (pGL3) y se mezcló por turbulencia suave con la pipeta, el tubo se mantuvo sumergido en hielo y se incubó por 15 minutos en hielo y posteriormente a -80 °C por 30 minutos.
- Se realizó el choque térmico a 42 °C por 90 segundos y se incubó en hielo por 3 minutos.
- Se agregaron 600 µL de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación por 1 hora.

- Se centrifugó a 5000 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante por decantación, dejando un volumen aproximadamente de 50 μ L de medio.
- Se resuspendió el pellet en el volumen de LB restante y se hizo el plaqueo en masivo de placas de medio sólido de LB + Ampicilina (150 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C por 16 horas máximo.

8.2.3.3. Identificación de colonias positivas

Para la identificación de colonias con el inserto de interés, se hizo siguiendo la siguiente metodología.

- Las colonias que crecieron en el medio con Ampicilina se consideran presuntas positivas y se pican y siembran en 500 μ L de medio LB + Ampicilina en tubos eppendorf de 1.5 mL y se incuban a 37 °C por 4 a 16 horas.
- Las colonias que presentan turbidez son consideradas positivas y se procede con la realización de PCR en colonia, teniendo en cuenta las necesidades del experimento (tabla 12 y 13).

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer 5x Phusion HF	2
DMSO	0.2
dNTPs 10 mM	0.2
Mg ⁺²	0.2
ADN _{pol}	0.1
ADN (cultivo con presencia de turbidez)	0.5
H ₂ O	5.8
Primer sentido (10 pmol/ μ L)	0.5
Primer antisentido (10 pmol/ μ L)	0.5

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre-desnaturalización	98	12 min	1
Desnaturalización	98	10 seg	35
Alineamiento	60	30 seg	
Polimerización	72	30 seg	
Extensión final	72	5 min	1

- Se hace el revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X y se corre a 100 V por 30 minutos.

8.2.3.4. Purificación de ADN plasmídico

Las colonias en las cuales se mostró el amplicón en el peso correspondiente son consideradas positivas, al azar se toma una y se procedió con la purificación de ADN plasmídico para su posterior utilización en la ligación con los fragmentos correspondientes del cassette interruptor, utilizando el kit DNA purification MiniPrep (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante descrito a continuación:

- Se puso un cultivo de 3 mL de medio LB + Amp de la clona seleccionada positiva, y se incubó por 16 horas a 37 °C con agitación constante.
- Se empaquetó a 8,000 rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se resuspendió el paquete celular en 250 µL de solución de resuspensión.
- Se adicionaron 250 µL de solución de lisis mezclando de suavemente hasta tener una solución homogénea y clara.
- Se adicionaron 10 µL de proteasa alcalina y se mezcló cuidadosamente hasta lograr una solución homogénea y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionaron 350 µL de solución de neutralización y se mezcló por inversión del tubo de 4 a 6 veces teniendo en cuenta que la solución de neutralización interactúe completamente con la solución anterior.
- Se centrifugó a 13,300 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se ensambla la columna en el tubo colector y se transfirió a ésta el sobrenadante del paso anterior de centrifugación. Se dejó interactuar con la columna por 2 minutos y se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto y se descartó el filtrado.
- Se agregaron 750 µL de solución de lavado a la columna y se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto, se descartó el filtrado. Se repite este paso con 250 µL de buffer de lavado.

- Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio y se le agregaron 40 μ L de agua libre de nucleasas previamente calentada a 55 °C y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto (1ra elución). Se repitió este paso para tener una segunda elución.
- Se tomó una alícuota para su cuantificación utilizando NanoDrop y se almacenó a -20 °C.

8.2.4. Ligación de CD *ATG4/ATG17* + *URA4* y clonación en *pJET1.2 blunt*

Una vez identificados los plásmidos, se hizo la restricción enzimática de los plásmidos para obtener los insertos con los extremos cohesivos para la posterior ligación por complementación, para posteriormente clonarlos y obtener los plásmidos *URA4 - CD - ATG4/ATG17 – pJET*.

8.2.4.1. Restricción enzimática de los plásmidos *CD - ATG4/ATG17-pJET1.2* y *URA4-pJET* y ligación

Para hacer las restricciones enzimáticas se siguió el protocolo del fabricante para cada una de las enzimas señalados en la **tabla 14**.

Tabla 14. Condiciones de para reacciones de digestión enzimática							
XhoI		NotI		KpnI		XmaI	
Reactivo	Volumen (μL)	Reactivo	Volumen (μL)	Reactivo	Volumen (μL)	Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 10X	2	Buffer 10X	2	Buffer 10X	2	Buffer 10X	2
Enzima (10 U/ μ L)	0.1	Enzima (10 U/ μ L)	0.1	Enzima (10 U/ μ L)	0.1	Enzima (10 U/ μ L)	0.1
Plásmido (200 ng/ μ L)	2.5	Plásmido (200 ng/ μ L)	2.5	Plásmido (200 ng/ μ L)	2.5	Plásmido (200 ng/ μ L)	2.5
Agua	cbp 10 μ L	Agua	cbp 10 μ L	Agua	cbp 10 μ L	Agua	cbp 10 μ L
<i>* Condiciones de incubación</i>							
37 °C por 3 -16 horas		37 °C por 3 -16 horas		37 °C por 1 hora		37 °C por 3 -16 horas	

En el caso de los fragmentos AB y URA, éstos se sacaron completos del vector de clonación con la previa limpieza utilizando el kit DNA Clean & Concentrator-5 (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante descrito a continuación:

- Se agregaron 40 µL de DNA Binding Buffer (Proporción 2:1) y se mezcló por pipeteo.
- La mezcla se transfirió a una columna previamente ensamblada en un tubo colector y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- Se adicionaron 200 µL de DNA Wash buffer y se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se repitió este paso una vez.
- Se ensambló la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 10 µL de agua libre de nucleasas a 55 °C y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 13,300 rpm por 1 minuto y se almacena -20 °C o puede ser usado para una siguiente reacción.

Una vez hecha la restricción simple o doble correspondiente se verifica por electroforesis en gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X corriendo a 100 V por 40 minutos, se corta la banda correspondiente y se hace la purificación del fragmento correspondiente siguiendo la metodología descrita en la **sección 2.2.2**, posteriormente a la reacción de ligación del gen URA4 digerido con NotI y KpnI con el plásmido CD-pJET1.2 blunt (ATG4/ATG17) utilizando la enzima ligasa T4 (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante descrito en la **tabla 15**.

Tabla 15. Condiciones para la ligación con el vector de clonación CD-pJET1.2 blunt + URA4	
Buffer de reacción 10X	2.5 µL
Producto de PCR 8 µL	10 µL
CD- pJET 1.2 blunt	10 µL
T4 DNA ligasa	1 µL
Agua	1.5 µL (cbp 25)
* Se incubó a 16 – 22 °C por toda la noche y se almacenó a 4 °C	

Para la confirmación de la ligación se hizo PCR a la reacción de ligación con las condiciones descritas en las **tablas 4 y 5** alineando los oligonucleótidos URA4-AS y CD-S (*ATG4/ATG17*) a 58 °C y en caso de ser positiva a la ligación de URA4-CD, se hizo la reamplificación en un volumen de 50 µL, se cortó la banda correspondiente y se purificó de acuerdo con el protocolo descrito en la **sección 8.2.2.2.**

Una vez obtenido el fragmento URA-CD-*ATG4/ATG17* por PCR se procede con la ligación clonación de éste fragmento en el vector de clonación pJET1.2 blunt, siguiendo los protocolos descritos en la **sección 8.2.3.4.**

8.2.5. Ligación de URA-CD *ATG4/ATG17* + AB *ATG4/ATG17* y clonación en pJET 1.2 blunt

Finalmente para la ligación de los fragmentos AB con URA-CD *ATG4/ATG17*, se siguieron los protocolos descritos en las **secciones 8.2.3 y 8.2.4**, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se hizo la digestión de los plásmidos URA-CD *ATG4/ATG17*-pJET1.2 blunt, para sacar el inserto completo haciendo primero la restricción con la enzima XmaI y posteriormente con NotI con la correspondiente purificación intermedia, debido a que sus buffers no son compatibles por diferencias en fuerza iónica.
- La ligación de los fragmentos AB con URA-CD *ATG4/ATG17* previamente digeridos, se hizo con la enzima DNA T4 ligasa (Promega) y fue confirmada por PCR utilizando los oligonucleótidos AB-AS y CD-S (*ATG4/ATG17*)

alineándolos a 58 °C. El amplicón de 3 kb en ambas construcciones, por lo que el tiempo de polimerización se extendió a 1 minuto con 20 segundos (modificaciones a la **tabla 5**).

- Una vez obtenido el amplicón de 3 kb correspondiente al cassette de interrupción se reamplificó y se clonó en el vector de clonación pJET1.2 blunt.
- Una vez confirmada la clonación el plásmido resultante se caracterizó por restricción enzimática (**Tabla 16**), PCR y secuenciación por el método de Sanger automatizado.

Tabla 16. Condiciones de para reacciones de digestión enzimática			
Bgl II		XbaI	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10X	2	Buffer 10X	2
Enzima (10 U/µL)	0.1	Enzima (10 U/µL)	0.1
Plásmido (200 ng/ µL)	2.5	Plásmido (200 ng/ µL)	2.5
Agua	cbp 10 µL	Agua	cbp 10 µL
* <i>Condiciones de incubación</i>			
37 °C por 1 hora		37 °C por 3 -16 horas	

- Para la secuenciación por el método de Sanger automatizado, se enviaron las muestras al Laboratorio de Servicios Genómicos del Cinvestav y se proporcionó el volumen necesario para 1 µg de ADN plasmídico y oligonucleótidos AB-AS y CD-S (*ATG4/ATG17*), que amplifican el cassette completo.

8.2.6. Transformación de *S. pombe*

Una vez identificados los plásmidos con las construcciones de ADN recombinante, se procedió con la transformación de la levadura *S. pombe*, en este apartado se utilizaron diferentes cepas con auxotroffías a URA4 (**Tabla 17**).

Tabla 17. Cepas utilizadas para la transformación de <i>S. pombe</i>		
Cepa	Genotipo	Procedencia
<i>S. pombe</i> 3D	<i>h⁺ leu1-32, ade6-M250, ura4-D18, ape1⁻, dpa1⁻</i>	Villa L y Suárez Rendueles, 1994
<i>S. pombe</i> 826	<i>h⁺/ h⁺ leu1-32/ leu1-32, ade6-M210/ade6-M250, ura4-D18/ura4-D18</i>	ATCC
<i>S. pombe</i> 4X	<i>h⁺ leu1-32, ade6-M250, ura4-D18, his7-366</i>	ATCC

Para hacer la transformación se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Se hizo un precultivo de *S. pombe* de 5 mL en medio líquido YE, se incubó a 29 °C por 24 horas con agitación constante (200 rpm).
- Con 3 mL precultivo se inocularon 22 ml de medio YE y se incubó a 29 °C con agitación constante hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1.5 (24 horas aproximadamente).
- Se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante, las células se lavaron con 5 ml de agua estéril y se centrifugaron a 3000 rpm por cinco minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- Se suspendieron las células en 5 mL de LiOAC/TE frío (la solución se debe mantener en hielo) y se incubaron a 29 °C con agitación constante por 30 minutos.
- Se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 100 µl de LiOAC/TE frío, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se mantuvo en hielo a partir de este paso y hasta este paso se considera la preparación de células competentes para transformación.
- Se tomaron en 15 µL de células competentes en tubo de 1.5 mL para cada transformación, se les agregó 15 µL de ADN de esperma de salmón (10 µg/ µL hervido previamente por 5 minutos), se agregó el volumen necesario para tener de 250-500 ng de vector previamente linealizado (con enzima de

restricción XbaI). Se mezcló por turbulencia suave con pipeta teniendo el tubo en hielo.

- Se incubó a 29 °C por 10 minutos y posteriormente se agregó PEG40%/LiOAc/TE en una proporción 3:1 (120 µl) Y se incubó por 30 minutos a 29 °C.
- Se hizo el choque térmico a 42 °C por 7 minutos e inmediatamente se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante.
- El pellet de células se resuspendió en 1 ml de medio YE y se incubó por 90 minutos a 29 °C con agitación constante.
- Se centrifuga 2500 rpm por 5 y se eliminó el sobrenadante, se hizo un lavado con 500 µL de agua estéril y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante por decantación.
- El pellet de células se resuspendió en el líquido remanente y con éste se plaqueó en masivo placas de medios sólido YNB con los requerimientos auxotróficos necesarios (sin uracilo en el caso de la interrupción).
- Se incubó a 29 °C y se observaron colonias después de 5 días.

8.2.6.1. Identificación de colonias transformadas de *S. pombe* por PCR

Las colonias crecidas en la placa de medio YNB se picaron y se sembraron en 500 µL de medio líquido YNB con los requerimientos auxotróficos necesarios que permitieran la selección, se incubaron a 29 °C con agitación constante por 48 - 72 horas, los tubos que presentaron turbidez, se consideraron presuntos positivos.

Para la identificación de colonias presuntamente positivas a la interrupción de los genes ATG4/ATG17 se hizo PCR en colonia amplificando el ORF de URA4 (**Tabla 12 y 18**) y el cassette completo AB-AS con CD-S (ATG4 ó ATG17) de acuerdo con las posibilidades de entrada al cromosoma por recombinación homóloga.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre-desnaturalización	98	15 min	1
Desnaturalización	98	10 seg	35
Alineamiento	58	90 seg	
Polimerización	72	30 seg	
Extensión final	72	5 min	1

A partir de las colonias positivas se hizo en la purificación de ADN cromosómico siguiendo el siguiente protocolo descrito en la sección 1.3 o el protocolo de Hoffman 2001 modificado descrito a continuación:

- Se inoculó un cultivo de 3 mL de medio líquido YE con 50 µL de la colonia presunta positiva, se incubó por 48 horas a 29 °C con agitación constante.
- Se centrifugó 8000 rpm por dos minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se hizo la disrupción enzimática de la pared de la levadura agregando 0.2 mg de Zymoliasa 20T resuspendida en 60 µL de buffer de Zymoliasa y se incubó a 37 °C por 45 minutos con resuspensión cada 10 minutos.
- Se centrifugó 8000 rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se adicionaron 200 µL de solución de lisis y se mezcló por pipeteo hasta lograr el lisado (5 minutos).
- Se agregaron 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se mezcló en vórtex por 30 segundos.
- Se centrifugó 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.
- Se adicionó 1 µL de RNasa y se incubó a 37 °C por 15 minutos.
- Se adicionaron 50 µL de acetato de sodio 3 M a pH 5.2.
- Se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente, se incubó cinco minutos a -20 °C, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante.
- Se agregó 1 ml de etanol al 70% para lavar el pellet y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante.

- Se secó el pellet a temperatura ambiente sin exceder los 10 minutos y se agregaron 40 μ L de agua libre de nucleasas a 55 °C.
- Se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

Para la confirmación de las clonas se hicieron diferentes reacciones de PCR, utilizando oligonucleótidos que amplifican el cassette completo, una región dentro del gen deletado como control negativo, y una región ubicada en el cromosoma que flanquearía el cassette de interrupción en caso de haberse insertado.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Determinación de los niveles de ARNm de los genes *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a*

9.1.1. Cultivo y envejecimiento cronológico de *S. pombe*

De acuerdo con resultados obtenidos por Roux en 2009, Segundo, PL en 2015, Lancho, D. en 2015, los días óptimos para el estudio del envejecimiento cronológico en la cepa de *S. pombe* 972 están en el intervalo comprendido entre los 6 y los 15 días; cabe destacar que fue de particular interés el día ocho en el cual se mostraron los mayores cambios en la expresión de los niveles de ARNm de los genes *ATG4*, *ATG14*, *ATG17*, *PCA1*, *FMA1* e *ICP55*, por lo que se trabajaron las mismas condiciones de cultivo.

Para el caso particular de la cepa de *S. pombe* 826, las condiciones de cultivo fueron diferentes a la cepa 972h- de acuerdo con los protocolo de estudio del envejecimiento cronológico en *S. pombe* la cepa 826 se sembró en medio YE con 2% de glucosa. Para el estudio del envejecimiento se pueden utilizar diferentes medios de cultivo, tales como el medio de extracto de levadura (YE) suplementado con los componentes auxotrófico, particularmente, el envejecimiento cronológico en levadura se estudia durante la fase estacionaria de cultivo, en el cual las células se encuentran en fase G_0 , tomando en cuenta los efectos de la disponibilidad durante el envejecimiento cronológico se trabajó con una concentración de 2% glucosa (Roux, AE. 2009; Roux, AE., 2010). Las condiciones nutricionales durante el envejecimiento cronológico son muy importantes, la disponibilidad extra de algún nutriente puede tener efectos drásticos en la viabilidad de la levadura, afectando desde su morfología hasta su tamaño. Haciendo la comparación entre las condiciones de cultivo en un medio mínimo EMM y el medio de cultivo YE con 2% de glucosa, se observan diferencias en tamaño y morfología teniendo en el medio YE, células más grandes y con morfología bacilar más pronunciada que en los cultivos con medio EMM (**Figura 11 y 12**) (Segundo, PL. 2015; Lancho, D. 2015). De acuerdo con los protocolos de envejecimiento cronológico en *S. pombe* se hizo la evaluación de los

cambios en la morfología celular y los niveles de ARNm de los genes en *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a* en los días 2, 6, 8 y 11, en la cepa *S. pombe* 826 teniendo como control de células jóvenes el día 2 y posteriormente una comparación con células de la cepa *S. pombe* 972 en las mismas condiciones de crecimiento.

Envejecimiento cronológico de *S. pombe* 826

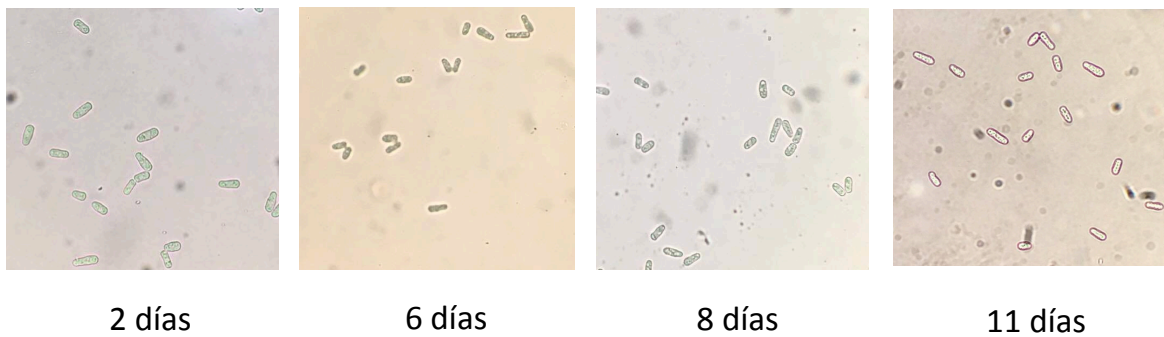


Figura 11. Envejecimiento cronológico de *S. pombe* 826. Cultivos de *S. pombe* 826 en medio YE con 2% de glucosa en condiciones de envejecimiento cronológico vistas al microscopio óptico a 40X. Las células mantienen su capacidad reproductiva en el día 2, la morfología bacilar se mantiene hasta los 11 días. Microscopía óptica de contraste de fases observada bajo el objetivo 40X.

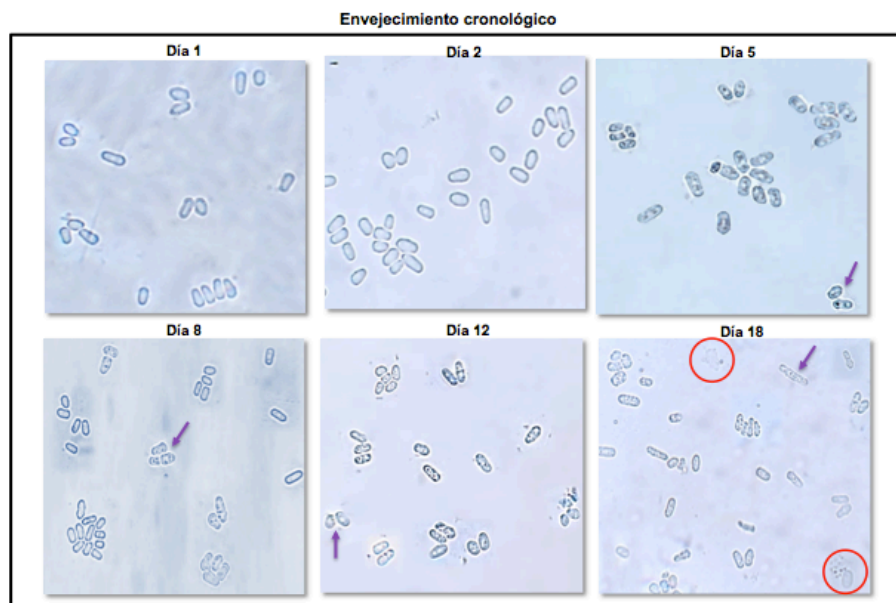


Figura 12. Evaluación de las características fenotípicas de *S. pombe* en los días 1, 2, 5, 8, 12 y 18 de CLS. Se observa que en los días 1 y 2 de cultivo de *S. pombe* la población es homogénea de forma cilíndrica de igual tamaño, sin embargo, a partir del día 5, la población se vuelve heterogénea, donde las células presentan diferentes morfologías (flechas moradas), el volumen celular disminuye y la pared celular se engruesa. En el día 18, se observan células muertas (Círculos rojos) y una población aún más heterogénea. Microscopía óptica de contraste de fases observada bajo el objetivo 100X (Tomado de Lancho, D., 2015).

De acuerdo con las microfotografías mostradas en la **figura 11**, se puede observar el cultivo en fase estacionaria desde el día 6, ya que no se observan células en división. Cabe mencionar que desde el día 6 es posible observar gránulos de estrés o vacuolas en el citoplasma de las levaduras; sin embargo, éstas se mantienen vivas, ya que no se observó en ninguno de los campos células muertas. Se ha observado que el envejecimiento en levaduras es resultado en parte por el daño celular debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROS); los cultivos con altas concentraciones de glucosa acumulan más EROS (Roux, AE., 2009; Hlavatá, L., 2008). A pesar de que en este trabajo se trabajó con la misma concentración de glucosa en el medio mínimo, se pueden observar diferencias debido a que la cepa *S. pombe* 826 tiene una mayor disponibilidad de nutrientes aportados por el medio YE, lo cual se ve reflejado en el tamaño, la morfología y la presencia de gránulos de estrés pronunciados en condiciones de envejecimiento. De acuerdo con las observaciones anteriores se consideraron las condiciones óptimas para el estudio del envejecimiento cronológico.

9.1.2. Diseño de oligonucleótidos para qPCR

En un trabajo previo se midieron los niveles de los transcritos ATG4 y ATG17; sin embargo, éstas enzimas son de baja expresión y el gen constitutivo utilizado fue ACT1 el cual es de alta expresión. De acuerdo con los protocolos de PCR en tiempo real, se recomienda hacer la comparación con genes constitutivos que tengan niveles de expresión similares, teniendo esto en cuenta se hizo el diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real de los genes SDH1 (subunidad de la succinato deshidrogenasa) y HPT1 (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa), los cuales son considerados de media y baja expresión y están validados para el análisis de genes por PCR en tiempo real (Vandesompele, J., 2002; Segundo, PL., 2015). Por otro lado, se hizo el diseño de oligonucleótidos para evaluar los niveles del transcrito del gen ATG18a en condiciones de envejecimiento cronológico y así ampliar la información sobre su participación en el proceso de autofagia durante el envejecimiento.

Tomando las consideraciones necesarias para en el diseño de oligonucleótidos de qRT-PCR el diseño de HPT1 se hizo flanqueando un intrón. Los diseños de oligonucleótidos que se hicieron en este trabajo para la evaluación de genes por tiempo real se muestran en la **tabla 19**.

Tabla 19. Oligonucleótidos diseñados para qRT-PCR.					
Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	GC (%)	PM (g/mol)	Tamaño (pb)
HPT1-s	5'- AGA TGT GTG CTC AAC AGG CAG A -3'	58.8	50	6808.5	439 (ADNc)
HPT1-as	5'- AGC CAT TGG TCT CAG CCT GTA TG -3'	59.1	52.5	7030.6	164 (ARN)
SDH1-s	5'-CAC AGA TTC CGT GCT CAC AAG ACT -3'	59.1	50	7281.8	130
SDH1-as	5' GTT TCT CGT GCT GGA CTT CCT CTA C 3'	58.9	52	7565.9	
ATG18a-s	5'- GTG TTC GCT GTT TGT GCT CTT TCA C -3'	59	48	7611.9	109
ATG18a-as	5'- ACT GGA GGA CTC ACC TTC CGT -3'	60	57.1	6471.2	

9.1.3. Estandarización de condiciones de amplificación para los genes *ATG4*, *ATG17*, *SDH1*, *HPT1* y *ATG18a*

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación de los genes *SDH1*, *HPT1* y *ATG18a*, fue necesaria la purificación de ADN cromosómico y este se utilizó como plantilla para hacer las pruebas por PCR de punto final, en los cuales la temperatura óptima de alineamiento fue de 60 °C, obteniendo los resultados mostrados en la **figura 13**, en los cuales se muestra un solo amplicón. Debido a que la amplificación se hizo a partir de ADN cromosómico el en el caso del gen *HPT1* se observa el amplicón de 439 pb debido a que éste gen presenta intrones, en el caso de *SDH1* y *ATG18* se muestran los amplicones en el peso de 130 ob y 109 pb correspondientemente a lo esperado.

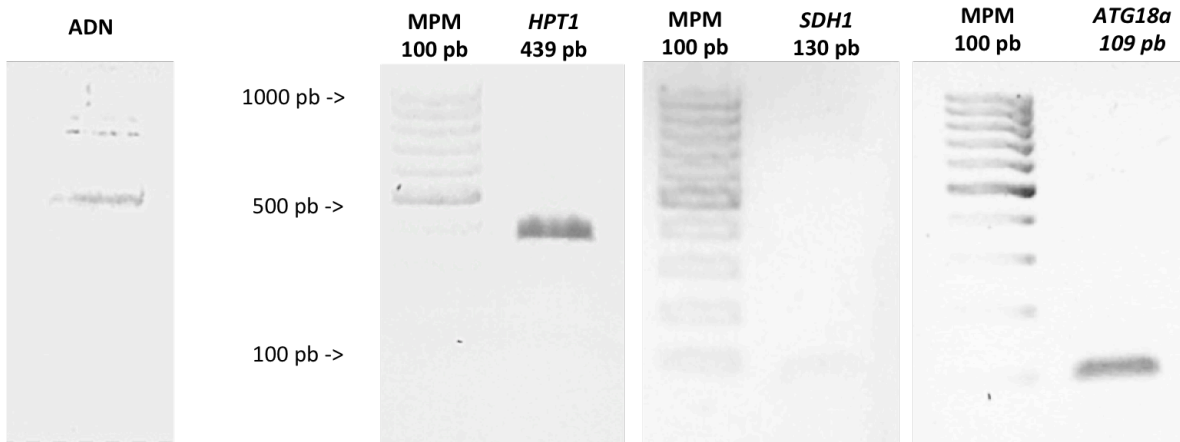


Figura 13. Optimización de condiciones de PCR para los genes HPT1, SDH1 y ATG18a. A la izquierda se observa la purificación ADN cromosómico el cual fue usado como plantilla para la amplificación de los genes HPT1, SDH1 y ATG18a, a 60 °C.

Posteriormente, se realizó la purificación de ARN (**Figura 17**), la obtención de curvas estándar (**Figura 14**) para la qRT-PCR y las curvas de Melting (**Figura 16**). Alineando a 60 °C los oligonucleótidos para su hibridación con el ADNc (ADN complementario) de los genes HPT1, SDH1 y ATG18a sin generar productos inespecíficos como lo muestra el pico único característico en la curva de Melting. El rango dinámico de amplificación es de 1.25 a 20 ng, la concentración ARN total utilizada como plantilla fue de 10 ng. Adicionalmente se realizaron las curvas estándar y de Melting de *Atg4* y *Atg17* cuyos diseños se hicieron en un trabajo previo (**Figura 14 y 16**) (Segundo, PL., 2015). Para asegurar que el gen constitutivo utilizado en este trabajo tenga las condiciones óptimas para hacer los ensayos de qRT-PCR, se hicieron las curvas de validación (**Figura 16**), en las cuales se observa una pendiente menor a 0.07, por lo que el gen SDH1 es apto para su uso en qRT-PCR.

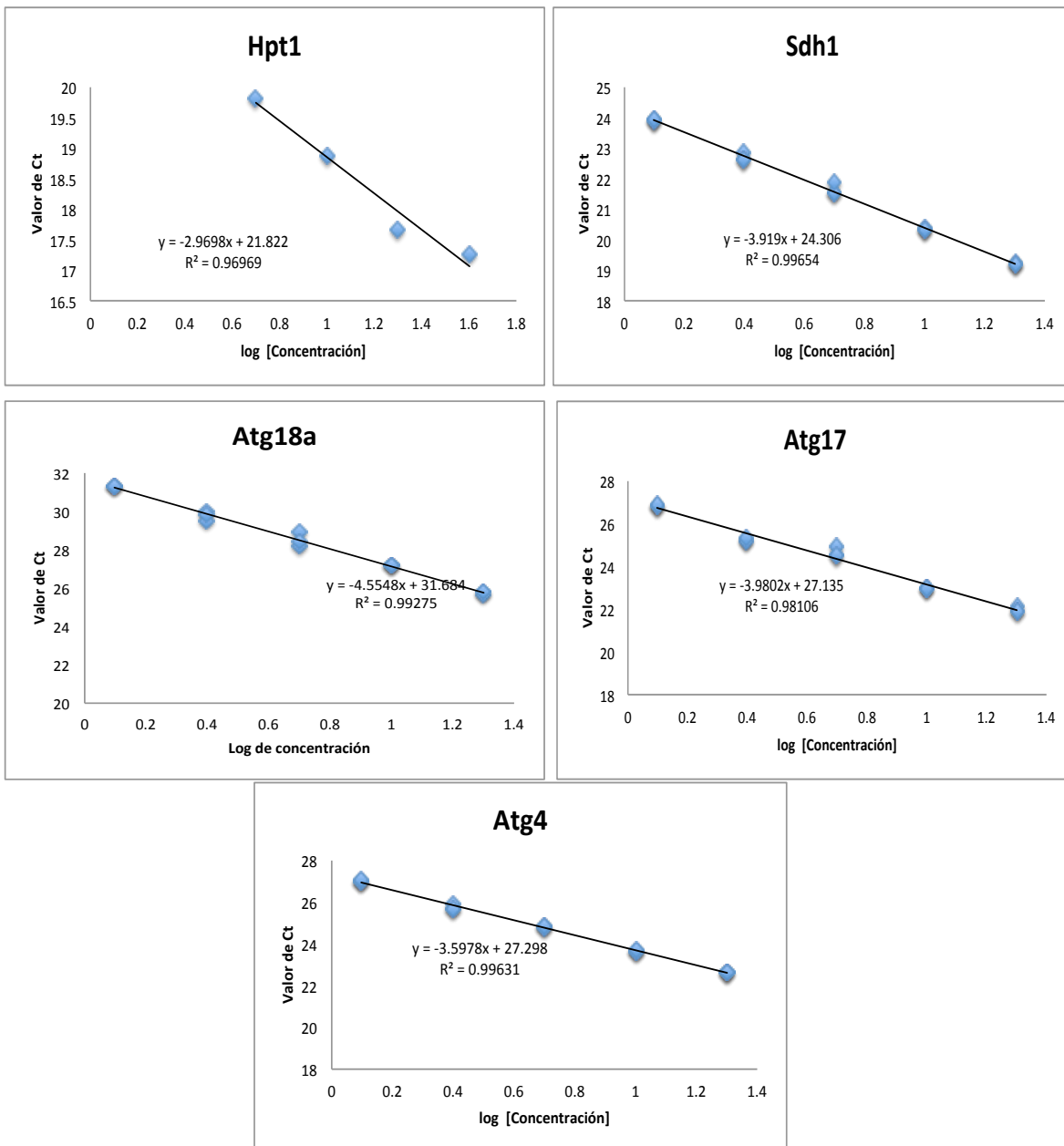


Figura 14. Curvas estándar de los genes HPT1, SDH1, ATG18a, Atg17 y Atg4. Las curvas estándar obtenidas tienen R² mayor al 0.95, con una pendiente negativa entre -2.9 y -4.6. El rango dinámico de amplificación se determinó en el intervalo de los 20 hasta los 1.25 ng.

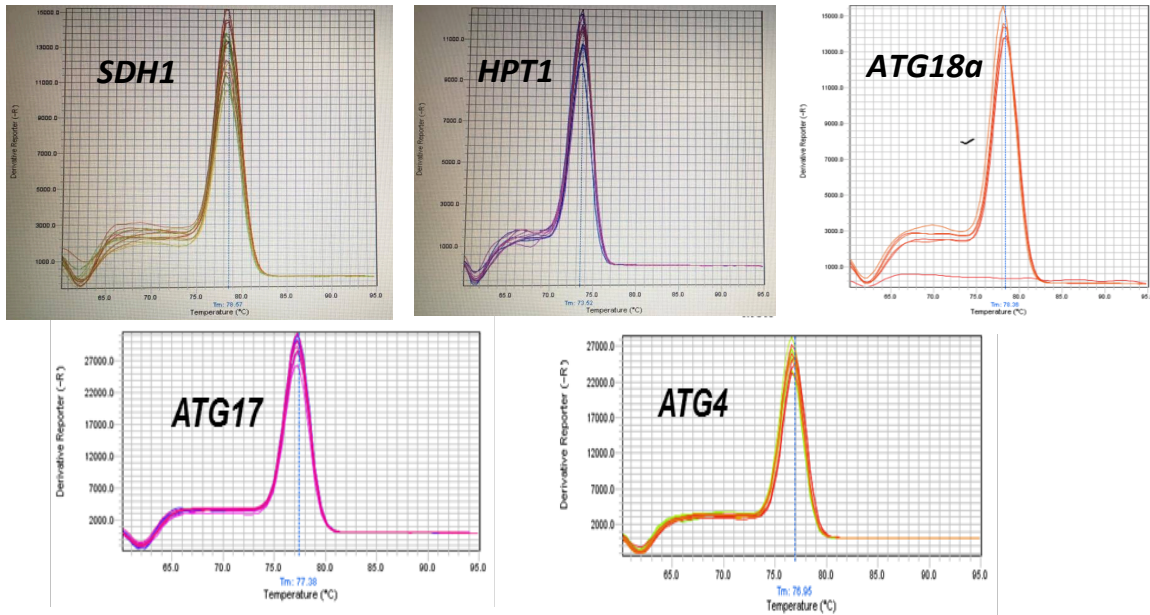


Figura 15. Curvas de melting de los genes *SDH1*, *HPT1*, *ATG18a*, *ATG17* y *ATG4*. Se puede observar un solo pico en la curva de Melting para cada uno de los pares de oligonucleótidos, característico de un solo amplicon en la reacción de qRT-PCR.

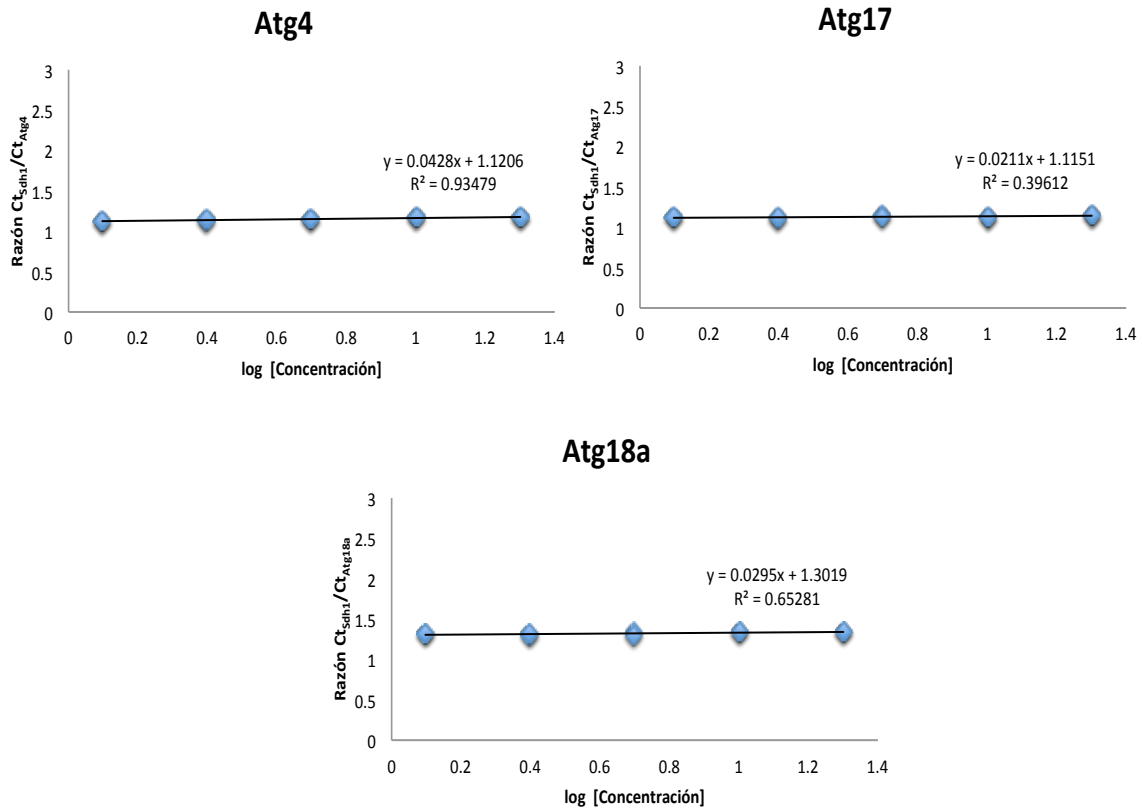


Figura 16. Curvas de validación de los genes *ATG18a*, *ATG17* y *ATG4*. Cada ensayo se hizo calculando la razón del promedio de Ct del gen ednógeno *SDH1* entre el gen problema (*ATG4*, *ATG17* y *ATG18a*). Se puede observar una pendiente menor a 0.07 característico de la compatibilidad de los genes constitutivo y problema.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las curvas estándar y las curvas de Melting se determinó que el gen constitutivo adecuado para los ensayos era *SDH1* para los estudios por qRT-PCR, con una pendiente parecida a la de los genes problema así como un coeficiente de correlación óptimo más cercano a uno $R^2 = 0.99654$, comparado con el $R^2 = 0.96969$ de la curva de *Hpt1*, asegurando la reproducibilidad de los ensayos.

9.1.4. Cuantificación de los niveles de los transcritos de *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a* en condiciones de envejecimiento cronológico

9.1.4.1. Niveles de los transcritos de *ATG4*, *ATG17* en la cepa *S. pombe* 972

Para la determinación del nivel de los transcritos de *ATG4* y *ATG17* en condiciones de envejecimiento cronológico, se obtuvieron muestras de 2, 6 y 8 días de cultivo de la cepa *S. pombe* 972 en medio EMM, se purificó su ARN total (**Figura 17**) y se procedió con la evaluación de los transcritos.

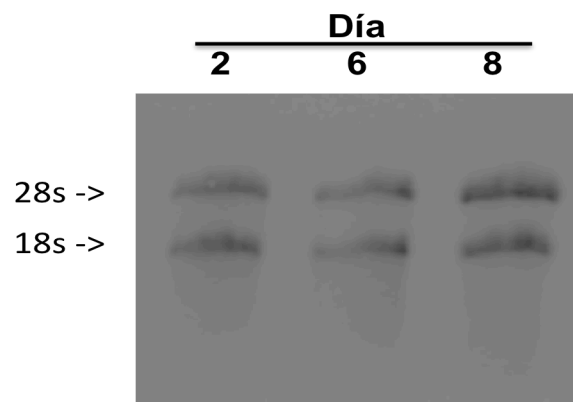


Figura 17. ARN total de células de *S. pombe* 972 en condiciones de envejecimiento cronológico. Se observan las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28s y 18s.

Los resultados indican cambios en los niveles de los transcritos *ATG4* y *ATG17* con una disminución significativa en los días 6 y 8 de envejecimiento lo cual sugiere que el proceso de autofagia está desregulado lo que aumenta el estrés intracelular (**Figura 18**).

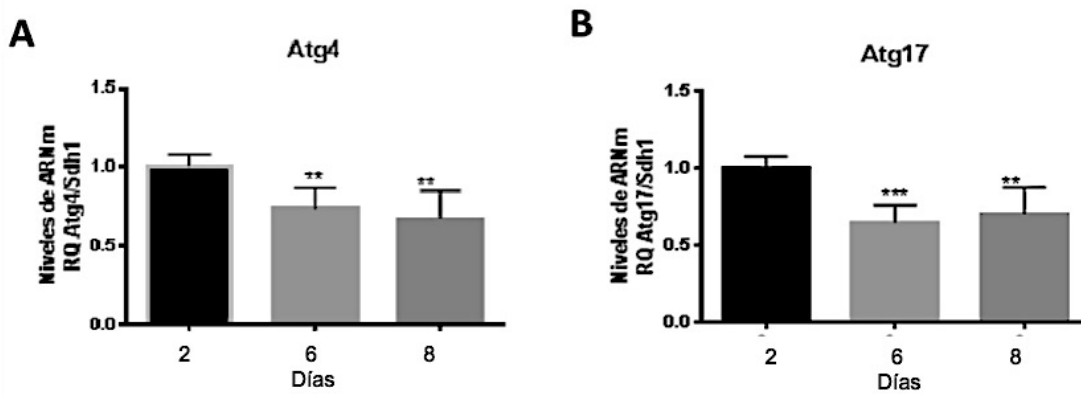


Figura 18. Niveles de expresión de ARNm de los genes *ATG4* y *ATG17* en condiciones de envejecimiento cronológico en la levadura *S. pombe* 972 h en medio EMM. Las gráficas muestran que los niveles de ARNm para *ATG4* (A) y *ATG17* (B) disminuyen desde el día 6 de envejecimiento, se graficó el valor de RQ resultante del ensayo por el método de $\Delta\Delta C_t$ utilizando como control endógeno *Sdh1*. ** Diferencia significativa con $p < 0.01$. *** Diferencia significativa con $p < 0.001$ ANOVA de una vía para medidas repetidas seguida de post-test Dunnett, cada día fue comparado contra el día 2.

Como se puede observar en la **figura 18** los niveles del transcrito de *Atg4* se ven disminuidos al día 6, lo cual puede tener repercusiones importantes en la eficiencia del proceso de autofagia, como se sabe la actividad de la cistein proteasa *Atg4* es muy importante durante el proceso de autofagia debido a que se encarga de la activación inicial de la proteína *Atg8* mediante la escisión del péptido carboxilo terminal para la posterior lipidación, necesaria para formar los autofagosomas. *Atg8* es una proteína importante para el reconocimiento del cargo y para el reciclaje de ésta es necesaria la desconjugación de PE, donde *Atg4* tiene la capacidad de cumplir esta función (**Figura 7**). Por lo que su participación durante el envejecimiento es importante para mantener la homeostasis celular; sin embargo, durante el envejecimiento los niveles de EROS aumentan, consecuentemente el daño de macromoléculas en el citoplasma. Normalmente el aumento de EROS tiene como consecuencia la activación de vías de respuesta al estrés, entre las que destaca, la autofagia; sin embargo, durante el envejecimiento la eficiencia de éste proceso se encuentra disminuida, lo cual tiene como consecuencia el aumento de macromoléculas y organelos dañados en el citoplasma y como consecuencia el declive las funciones fisiológicas observadas durante el envejecimiento (Lapierre, LR., 2015; Filomeni, G., 2015; Fernández,

ÁF., 2015). Por lo que si disminuyen los niveles de expresión de Atg4 y perse su actividad, el proceso de autofagia no se llevaría a cabo de manera optima para compensar los daños celulares ocurridos durante el estrés y éste sería uno de los causantes del fenotipo de envejecimiento (**Figura 18**). Así como en Atg4 los niveles del transcrito de Atg17 también se observan disminuidos, Atg17 tiene un papel fundamental durante la iniciación del proceso específico de macroautofagia, ya que ésta es capaz de regular la magnitud del proceso, regulando el tamaño y forma de los autofagosomas por lo que es importante para la eficiencia del proceso aunque no fundamental ya que el proceso se puede llevar acabo en su ausencia (Cheon, H., 2005). Sin embargo, se ha observado que mutantes de esta proteína tienen un efecto directo en la longevidad de la levadura, por lo que su participación durante el proceso de envejecimiento es importante para mantener la eficiencia óptima del proceso de autofagia (Garay, E., 2014), esto podría ser debido a que se ha observado que en mutantes Δ Atg17 el tamaño de los autofagosomas se ve disminuido significativamente, lo cual puede tener repercusiones en su eficiencia y en el caso de disminuir los niveles de expresión de Atg17, se esperaría que cambiara la morfología de los autofagosomas y la eficiencia del proceso de autofagia disminuya, teniendo como efecto la disminución del mantenimiento de la homeostasis y por ende provocar un fenotipo de envejecimiento.

9.1.4.2. Niveles de los transcritos de ATG4, ATG17 y ATG18a en la cepa *S. pombe* 826

Debido a la importancia de los datos anteriormente expuestos, se planteó la generación de mutantes con la interrupción génica de ATG4 y ATG17, por lo que fue necesario hacer la evaluación del nivel de los transcritos de estos genes en la cepa *S. pombe* 826 utilizada para la interrupción génica en los días 2, 6, 8 y 11 de cultivo, se purificó a ARN total y se hicieron los ensayos de qRT-PCR (**Figura 19 y 20**). Pero además en estas muestras se evaluó el nivel del transcrito de ATG18a debido a su importancia en el proceso de autofagia.

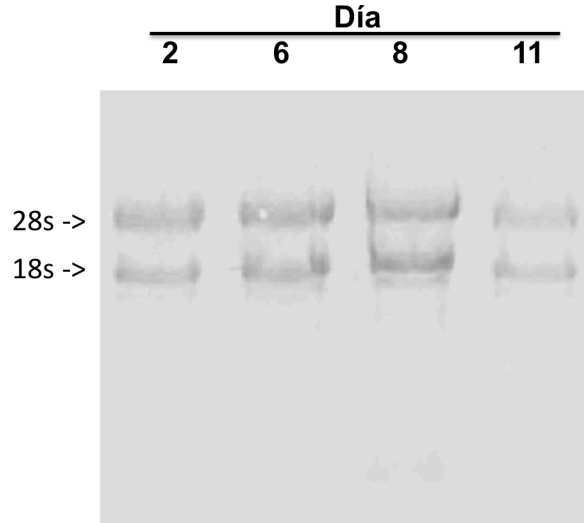


Figura 19. ARN total de células de *S. pombe* 826 en condiciones de envejecimiento cronológico. Se observa la integridad del ARN total caracterizado por la presencia de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28s y 18s.

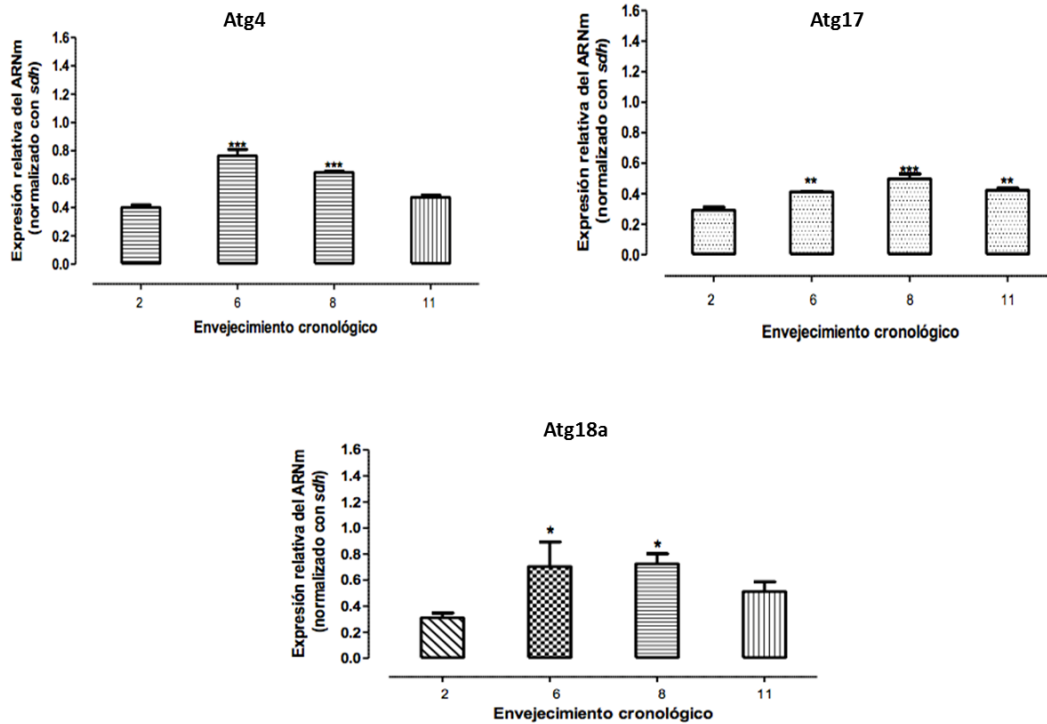


Figura 20. Nivel de ARNm de los genes *ATG4*, *ATG17* y *ATG18a* en condiciones de envejecimiento cronológico en la levadura *S. pombe* 826 en medio YE con glucosa al 2%. Se observa un aumento en los niveles de los transcritos desde el día 6 de envejecimiento y posteriormente un regreso a niveles basales al día 11. Diferencia significativa con * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. ANOVA de una vía para medidas repetidas seguida de post-test Dunnett, cada día fue comparado contra el día 2.

La evaluación de los niveles del transcrito Atg18a surgen a partir de la necesidad de obtener información sobre ésta proteína, la cual tiene un papel relevante durante el proceso de autofagia ya que entre sus funciones tiene que ver con los cambios en la localización de PI3PK, ésta tiene un papel importante para localizar los complejos de nucleación en el sitio de ensamble del fagoforo (PAS). ATG18 se encarga específicamente del direccionamiento de complejo Atg12-Atg5-Atg16 para la lipidación de Atg8-I, ésta es una de las últimas proteínas identificadas relacionadas a la autofagia (Mukaiyama, H., 2010; Sun, LL., 2013).

Las condiciones nutrimentales son muy importantes para la célula, a partir de éstas se orquestan una serie de respuestas moleculares a las condiciones del medio ambiente, para evaluar los niveles de los transcritos en la cepa de *S. pombe 826* se escogió trabajar con un medio completo YE con 2 % de glucosa ya que esta condición no se asocia con el crecimiento durante la fase estacionaria. El envejecimiento cronológico en este medio no es simple inanición ya que el crecimiento de una cepa silvestre en medio mínimo, extiende 3 veces la supervivencia que en un medio completo (Fabrizio, P., 2003; Roux, AE. 2006). Las vías que regulan el envejecimiento son variadas entre ellas las que tienen que ver con la disponibilidad y sensado de nutrientes donde participan las vías TOR/Sck2 y las vías Ras/Pka1, las cuales convergen en la activación de Rim15, que a su vez activa al factores de transcripción como Msn1 relacionados con la transcripción de factores de respuesta al estrés. La otra vía que es capaz de regular el envejecimiento se relaciona con la respuesta al estrés oxidativo por ROS, los cuales convergen en la activación de mecanismos protectores como la autofagia (Longo, VD., 2012). Según los resultados obtenidos en la **figura 20**, al evaluar el nivel de los transcritos, se puede observar que a partir del día 6 de envejecimiento hay un aumento significativo en los transcritos de los genes ATG4, ATG17 y ATG18a en la cepa de *S. pombe 826*, según la caracterización del envejecimiento cronológico en *S. pombe* después de 6 días de cultivo alrededor del 60% de la población está metabólicamente activa pero sólo el 2.3 % mantiene su capacidad replicativa la cual se pierde alrededor del día 15. Roux en 2006 afirma que existe una acumulación de EROS en el 25% de la población en el día 6 y ésta se duplica

alrededor del día 10 (Roux, AE., 2006), por lo que existe una correlación con el aumento de los niveles de los transcritos de ATG4, ATG17 y ATG18a ya que el aumento en los niveles de EROS activa la respuesta antioxidante y por ende la activación del proceso de autofagia, sin embargo, a pesar de que hay un aumento significativo de EROS al día 10, los niveles de los transcritos de ATG4, ATG17 y ATG18a disminuyen comparándolos con el día 6, lo cual podría ser indicativo de que el daño oxidativo se ha acumulado y la eficiencia de la respuesta celular al estrés disminuye paulatinamente, particularmente es probable que el proceso de autofagia no se lleva a cabo de manera eficiente a pesar de que se observan vacuolas en el día 11(**figura 11**).

9.2. Construcción de plásmidos para la interrupción por recombinación homóloga de los genes ATG4 y ATG17

Recientemente, los numerosos proyectos del genoma han provisto de una gran cantidad de genes de los cuales aún no se conoce su función. Tal información ha sido usada para los diseños pos-genómicos de micro-arreglos de DNA y el desarrollo de herramientas para proteómica. Sin embargo, estas herramientas miran el patrón de un genoma completo y no elimina la necesidad de estudiar un gen a detalle. En los últimos años se han desarrollado gran cantidad de herramientas bioinformáticas, que aportan una gran cantidad de información y una visión general de las funciones y características que puede tener una proteína; sin embargo, aún es necesario hacer el estudio para la caracterización bioquímica y el análisis funcional de éstas para corroborar la información dada por los análisis *in silico*. Para hacer el análisis funcional de genes el primer paso es la disrupción del gen de interés (Wendland, J., 2003)

La recombinación homóloga ha sido ampliamente utilizada para la obtención de cepas mutantes en levadura con interrupción de genes específicos. Éste es un tipo de recombinación genética en el cual las secuencias de nucleótidos son intercambiadas entre dos cadenas similares o idénticas de ADN, la cual produce nuevas combinaciones de secuencias de ADN durante el

entrecruzamiento cromosómico en la meiosis. Las nuevas combinaciones de secuencias de ADN representan una variación genética, que permiten a la población adaptarse a condiciones medioambientales en el tiempo. Este proceso se ha conservado a lo largo de la evolución en organismos como *S. pombe* (Wendland, J., 2003; Wang, L., 2003).

El reemplazamiento génico requiere de la construcción de un cassette de interrupción que contenga secuencias homólogas 5' y 3' del gen a reemplazar, las cuales flanqueen un gen de selección que sirva para identificar las clonas transformantes en una cepa con auxotrofia a un componente específico, la cual se transformará con la construcción linearizada y posteriormente la selección de las clonas que pudieran haber insertado el cassette. Debido a las limitaciones de los sitios de restricción permitidos en el gen de interés, muchas de estas construcciones son comúnmente llamadas como disrupción de genes en lugar de deleciones, debido a que el marcador de selección es insertado dentro del ORF permitiendo la posibilidad de la transcripción e incluso la traducción de una parte del gen interrumpido en algunos casos. La eficiencia de recombinación dependerá de la especificidad y el tamaño de las secuencias homólogas flanqueantes las cuales deben ser de >250 pb para aumentar la eficiencia en mutagénesis dirigida y la eficiencia de integración (Wang, L., 2003; Wendland, J., 2003; Wach, A., 1996; Grim, C., 1988).

La construcción del cassette de interrupción en el presente trabajo utilizó como gen de selección URA4 de *S. pombe* (2230 pb), se ha comprobado que tiene una alta integración y un bajo porcentaje de conversión génica (Grim, C., 1988), el cual se flanqueó por la región homóloga al promotor (AB) de 474 pb y 468 pb de los genes ATG4 y ATG17 respectivamente y una región homóloga al UTR 3' (CD) de 383 pb y 347 pb correspondiente a cada gen, para obtener cassettes de 3178 pb y 3166 pb para el reemplazo génico de los genes ATG4 y ATG17 respectivamente. Para poder unir los fragmentos por reacciones de ligación, las regiones AB están flanqueadas por las enzimas de restricción NotI y XhoI, el gen URA4 por NotI y KpnI y las regiones CD con XmaI y KpnI. Una vez construido el cassette para cada gen, se clonó en el vector de clonación pJET 1.2

blunt. Para hacer las construcciones de los plásmidos se siguió la metodología necesaria para generar los plásmidos enumerados en la **figura 21**. Al incorporarse la construcción interruptora al cromosoma de la levadura en cepas haploides y diploides por transformación, se espera la generación de cepas mutantes Δ Atg4 y Δ Atg17 por remplazo génico mediante recombinación (**Figura 22**).

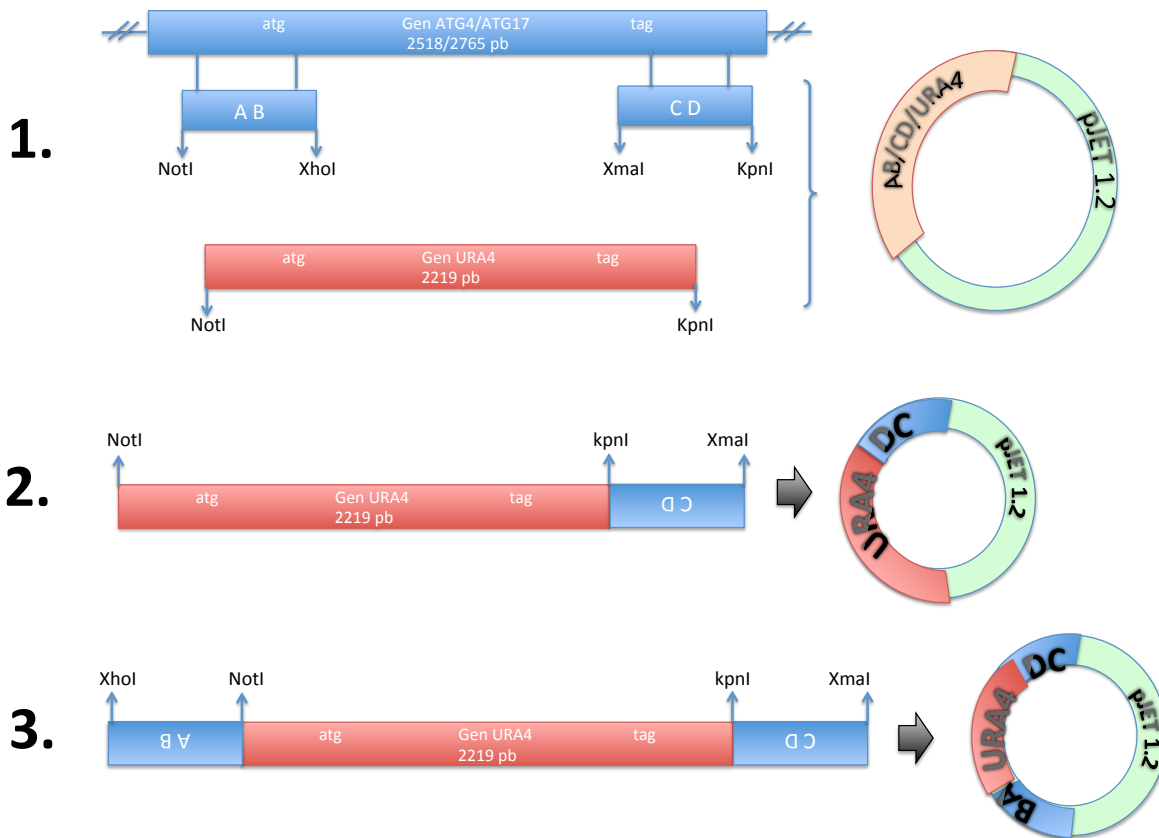


Figura 21. Estrategia para la construcción de cassette interruptor. 1. Amplificación y clonación de los fragmentos AB y CD del gen de interés y del gen de selección URA4. 2. Ligación y clonación del fragmento CD con URA4. 3. Ligación y clonación del fragmento AB con el fragmento CD-URA4.

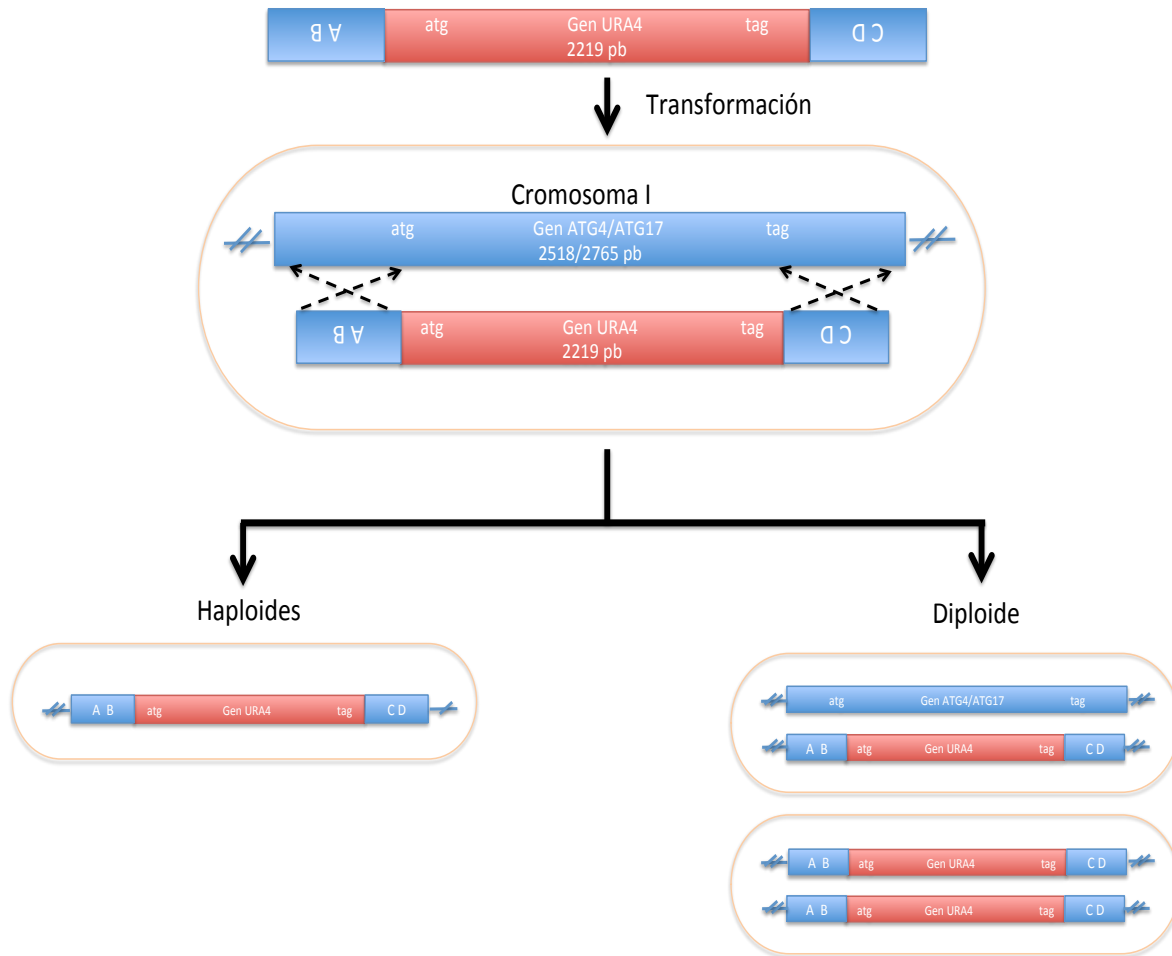


Figura 22. Esquema general de interrupción de los genes *ATG4* y *ATG17* utilizando un cassette de interrupción por recombinação homóloga y obtención de las posibles mutantes Δ *Atg4* y Δ *Atg17*.

Se optimizaron las reacciones de PCR para tener amplicones bien definidos en el peso correcto, los fragmentos AB y CD hibridaron a 59 °C (**Figura 23A**) y el fragmento del gen *URA4* hibridó a 62 °C (**Figura 23B**), cada fragmento fue reamplificado y purificado para tener una concentración adecuada.

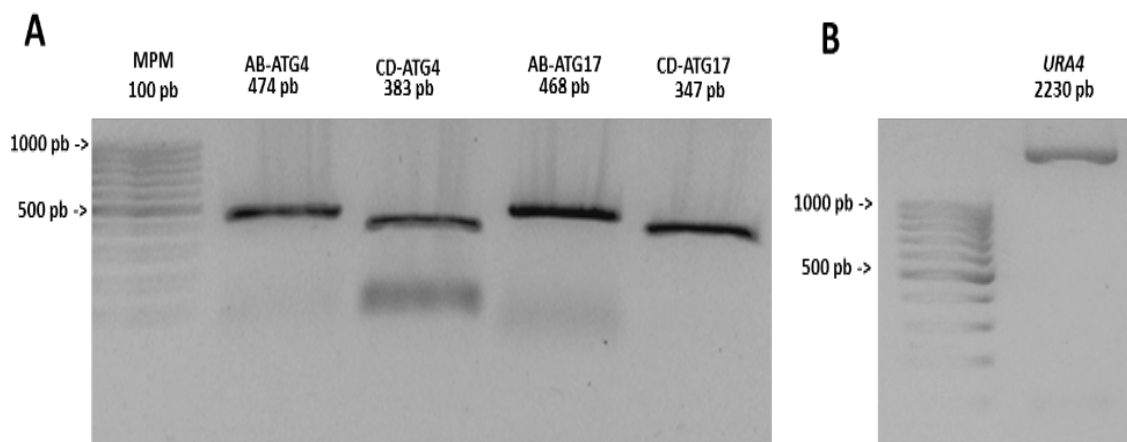


Figura 23. Amplificación por PCR de las secuencias para la construcción de la interrupción de los genes *ATG4* y *ATG17*. A) Amplificación por PCR de los fragmentos AB y CD de los genes *ATG4* y *ATG17*. B) Amplificación por PCR del gen *URA4*.

Cada fragmento fue clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt, el cual se encuentra comercialmente linealizado para la ligación de productos de PCR con extremos romos y ya que la enzima utilizada para amplificar los productos de PCR al amplificar deja extremos romos, se procedió con la ligación directa para ser utilizada en la transformación de la bacteria *E. coli* Top 10. Posteriormente, se seleccionaron las clonas recombinantes positivas con resistencia a ampicilina, se comprobaron por PCR en colonia y se cultivaron para la purificación del ADN plasmídico (**Figura 24A**). A partir de este se realizó otra PCR para su comprobación donde se pueden observar los amplicones en el peso aproximado a 474 pb para AB-ATG4, 383 pb para CD-ATG4, 468 pb AB-ATG17 y 347 pb para CD-ATG17 en la **Figura 24B** y 2230 pb correspondiente al gen *URA4* en la **Figura 24C**, obteniendo así los fragmentos resguardados en *E. coli* para su amplificación y utilización en experimentos posteriores.

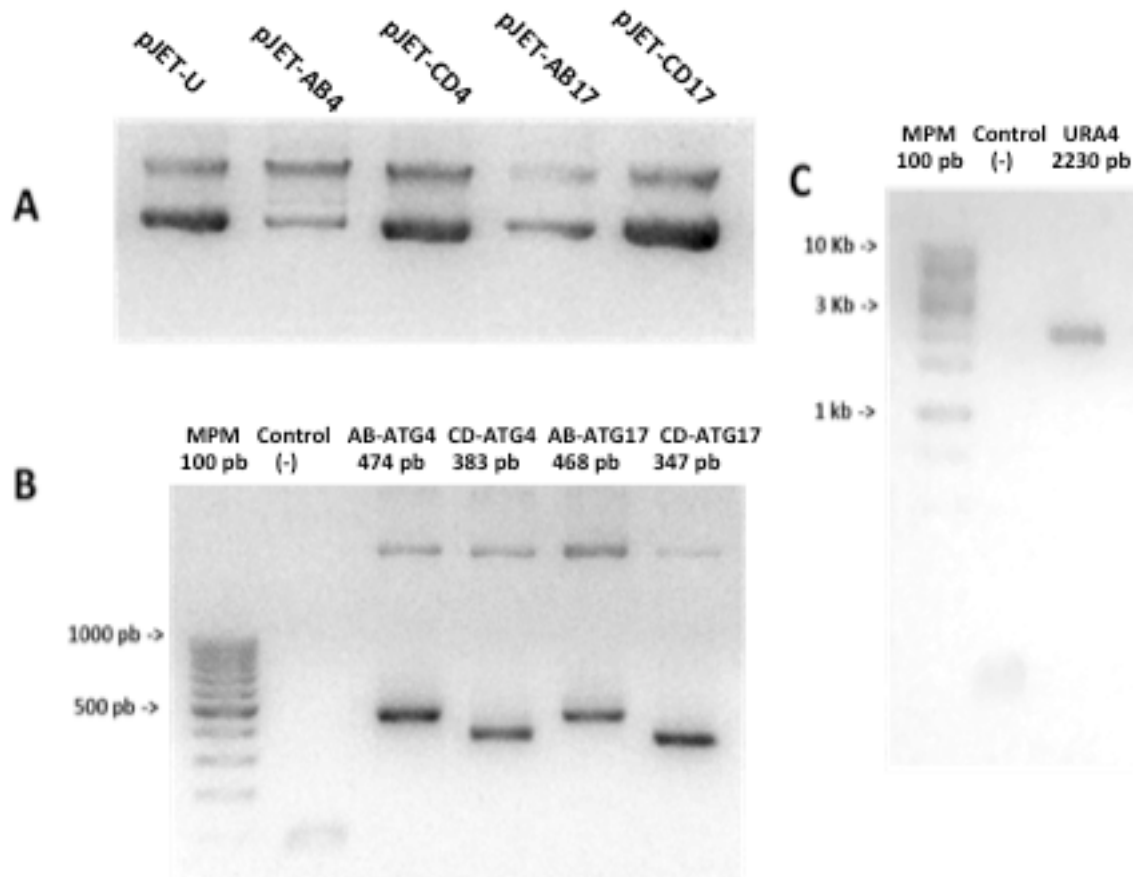


Figura 24. Purificación de ADN plasmídico y comprobación por PCR de los insertos AB y CD y el gen URA4. A) ADN plasmídico, los plásmidos fueron nombrados de acuerdo al inserto que fue introducido en el vector de clonación pJET 1.2 blunt de la siguiente manera: pJET-U (pJET 1.2 +URA4), pJET/AB4 (pJET 1.2 +AB-ATG4), pJET/CD4 (pJET 1.2 +CD-ATG4), pJET/AB17 (pJET 1.2 +AB-ATG17) y pJET/CD17 (pJET 1.2 + CD-ATG17). B) PCR de los fragmentos AB y CD utilizando como plantilla los ADN plasmídicos purificados. C) PCR del fragmento URA4 utilizando como plantilla ADN plasmídico.

Una vez clonados, se realizó la restricción enzimática de los fragmentos para el cassette interruptor. El primer paso fue digerir el plásmido pJET-Ura4 con las enzimas Not1 y Kpn1 (**Figura 25A**) para sacar el fragmento completo correspondiente al gen URA4 de 2230 pb con extremos cohesivos compatibles para ligarse con el fragmento CD, para lo cual los plásmidos pJET-CD4 y pJET-CD17 sólo fueron linearizados con la enzima Kpn1 donde se observaron los plásmidos linearizados en el peso aproximado correspondiente a 3357 pb en el caso de pJET/CD4 y 3321 pb para pJET/CD17 (**Figura 25B**) donde se dejó el

extremo compatible con URA cohesivo; como siguiente paso se procedió con la ligación del fragmento URA digerido con los plásmidos pJET-CD4 y pJET-CD17 y se hizo la comprobación de la ligación por PCR utilizando los primers ATG4 CD-S o ATG17 CD-S y URA-Not1-S, donde la amplificación de los productos ligados es de 2704 pb para URA-CD4 y 2698 pb para URA-CD17 indica la ligación positiva (**Figura 25C**).

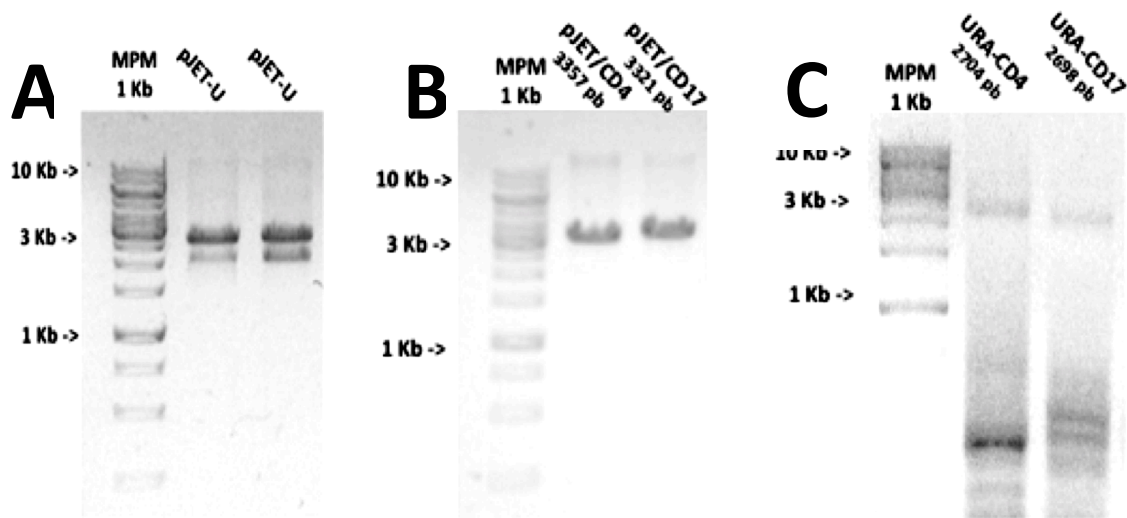


Figura 25. Ligación de los fragmentos CD con URA4. A) Digestión enzimática de pJET-U con Not1 y Kpn1. B) Plásmidos pJET/CD4 y pJET/CD17 linealizados con KpnI. C) Comprobación por PCR de la ligación de pJET/CD4 y pJET/CD17 con URA4 ligados por los extremos compatibles KpnI.

Una vez obtenidos los productos URA-CD4 y URA-CD17, se re-amplificaron y se clonaron nuevamente en pJET1.2 blunt, se purificaron los plásmidos y se digirieron con la enzima NotI y XmaI observando el producto de la digestión en 2700 pb aproximadamente para ambos, junto con el fragmento correspondiente al vector pJET 1.2 el cual tiene un peso de 2974 pb, por lo que se tuvo cuidado de cortar solo la banda correspondiente a 2700 pb, para eviat contaminación con el vector y así ligar solamente con el fragmento URA-CD (**Figura 24A**) dejando el extremo compatible para ligarse con el fragmento AB para lo cual se digirió el plásmido pJET1.2-AB4/AB17 con las enzimas con XhoI y NotI observando los

productos de la digestión en el peso aproximado de 474 pb para *ATG4* y 468 pb para *ATG17* (**Figura 26B**); una vez que los fragmentos se ligaran por el extremo digerido con *NotI*, la ligación fue comprobada por PCR utilizando los oligonucleótidos *ATG4* AB-AS y *ATG4* CD-S para la construcción Δ *Atg4* (3174 pb), y *ATG17* AB-AS y *ATG17* CD-S para la construcción Δ *Atg17* (3168 pb) (**Figura 26C**).

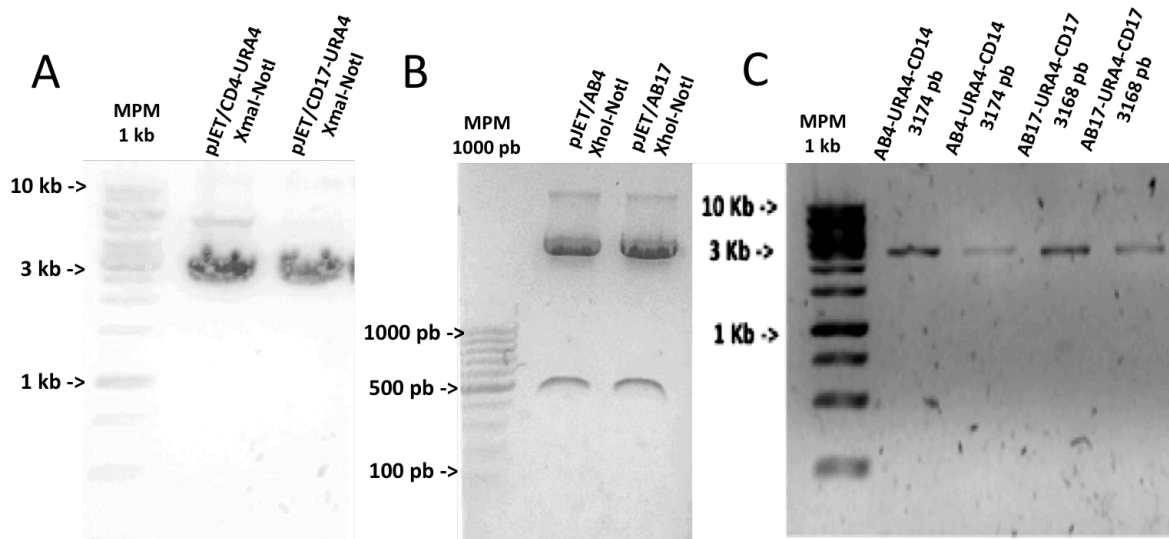


Figura 26. Ligación de los fragmentos AB con URA4-CD. A) Digestión enzimática de pJET/CD-URA4 con *NotI* y *XmaI*. B) Plásmidos pJET/AB4 y pJET/AB17 digeridos con *XhoI* y *NotI*. C) Comprobación por PCR de la ligación de URA4-CD4 y URA4-CD17 con AB4 Y AB17 ligados por los extremos compatibles.

Los productos se clonaron en el vector pJET 1.2 blunt en *E. coli* Top 10 y las colonias transformadas se identificaron por PCR en colonia, en la **figura 27B** se muestran el amplicón de 3168 pb en las clonas 3, 5 y 6 para el inserto correspondiente a Δ *Atg17* y en la **figura 27A** el amplicón 3174 pb en la clona 2 para el inserto Δ *Atg4*. Las construcciones Δ *Atg4* y Δ *Atg17* clonadas en pJET 1.2 fueron caracterizadas por restricción enzimática, de acuerdo con el mapa del vector (**Figura 28**). La restricción de las construcciones con la enzima *BglIII*, libera el inserto de 3102 pb para Δ *Atg4* y 3079 pb para Δ *Atg17* que corresponden a los cassettes completos, mientras que la digestión con la enzima *XbaI* la cual tiene un sitio de reconocimiento en el sitio múltiple de clonación linearizó los plásmidos

generando bandas en el peso correspondiente cassette completo más el vector (6030 pb Δ Atg4 y 6007 pb Δ Atg17) (**Figura 29**). En la **Figura 29** se infiere que efectivamente las construcciones tienen nuestro inserto y pueden ser utilizadas para transformar a *S. pombe*.

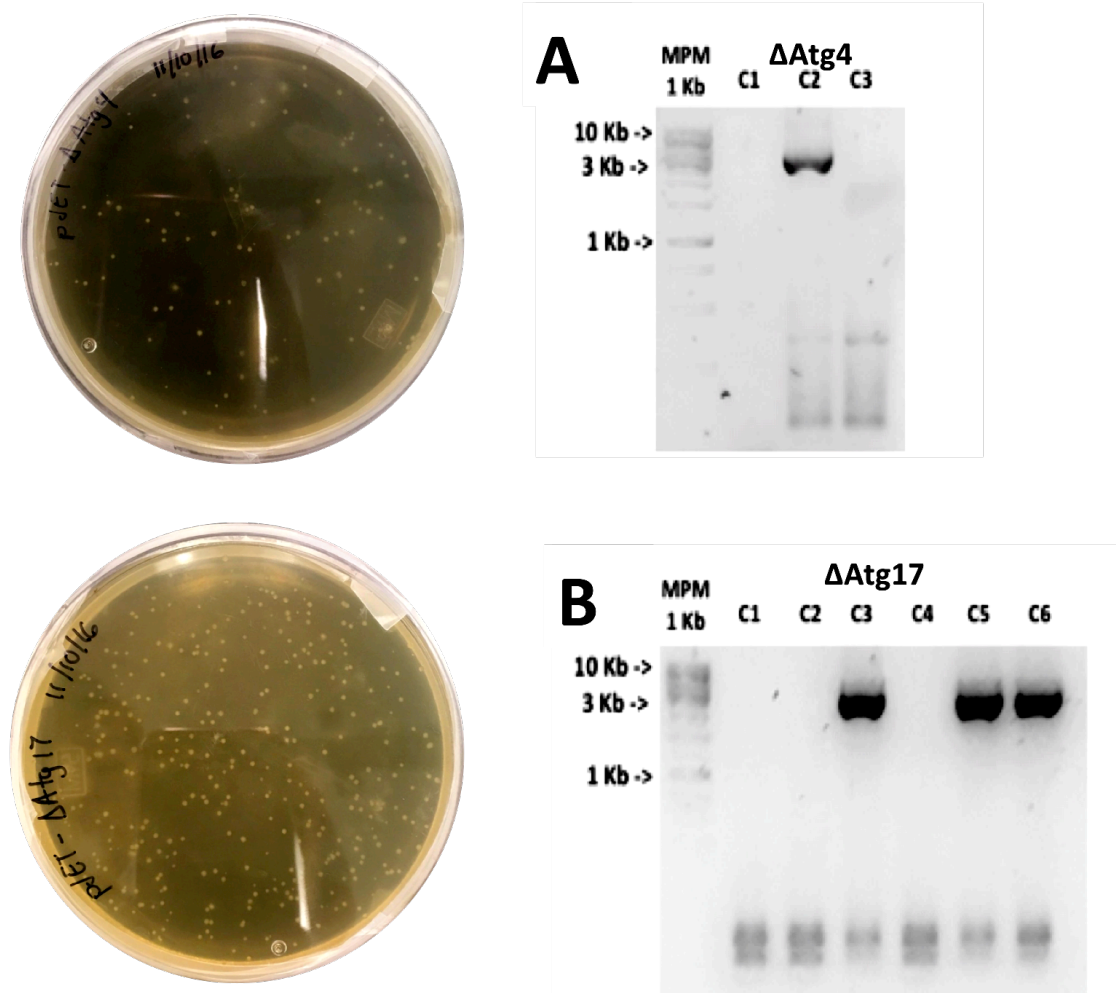


Figura 27. Confirmación por PCR en colonia de las colonias transformantes con el fragmento Δ ATG4 y Δ ATG17. Las colonias que mostraron turbidez en el caldo LB + Amp fueron evaluadas por PCR en colonia. A) Evaluación por PCR en colonia de 3 colonias, donde la colonia 2₁ resultó positiva al cassette Δ ATG4. B) Evaluación por PCR en colonia de 6 colonias, donde las colonias 3, 5 y 6 resultaron positivas al cassette Δ ATG17.

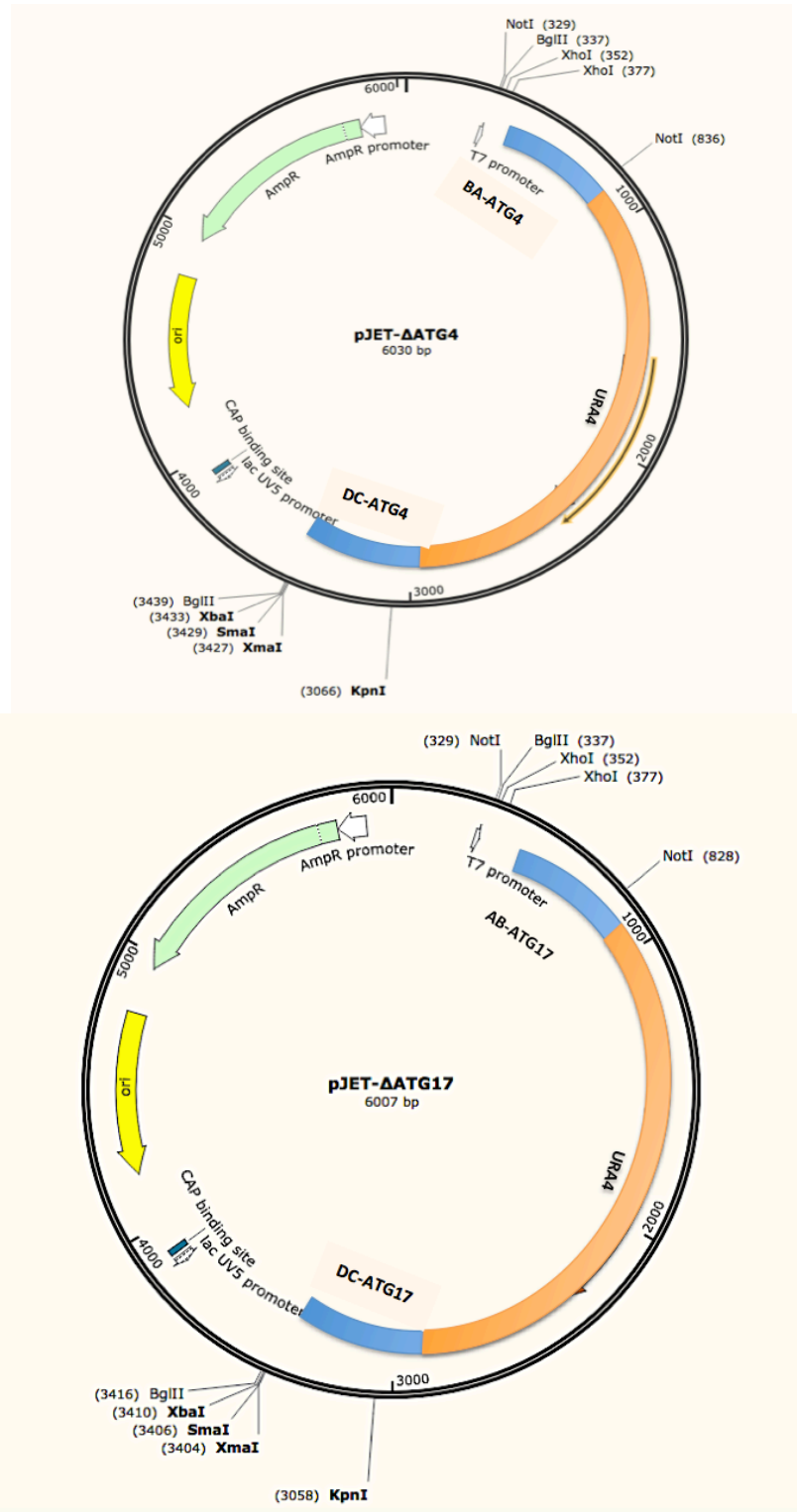


Figura 28. Mapa de los vectores pJET-Δatg4 y pJET-Δatg17. Construcción *in silico* utilizando el programa SnapGene, se muestran los sitios de restricción que flanquean el cassette de interrupción génica y el gen URA4 (<http://www.snapgene.com>).

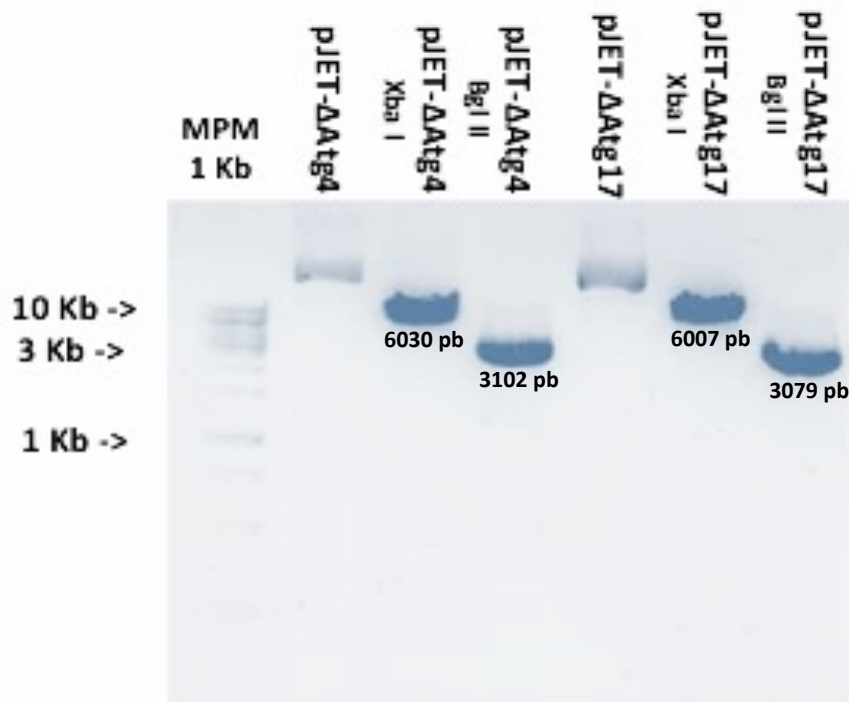


Figura 29. Digestión enzimática de los plásmidos pJET recombinantes Δ atg4 y Δ Atg17. En el carril 2 se muestra el plásmido pJET- Δ atg4 sin digerir, en el carril 3 digerido con XbaI, en el carril 4 digerido con BglII, en el carril 5 el plásmido pJET- Δ atg17 sin digerir, en el carril 6 digerido con XbaI y en el carril 7 digerido con BglIII.

Además se hizo la secuenciación de cada uno de los plásmidos con la construcción interruptora BA-URA-DC, utilizando los oligonucleótidos AB-AS (ATG4/ATG17) y CD-S (ATG4/ATG17) (**Tabla 10**). De acuerdo con la construcción y el área que se clonó del gen URA4, se deben mostrar coincidencias con las regiones en el cromosoma mostradas en la **figura 30**. En el caso de ATG4 la secuencia depositada en el GeneBank tiene su locus en las 4897936 a 4900012 en el cromosoma I, mientras que el locus del genATG17 se localiza en las posiciones1226090 a 1228894 y para URA4 de 115589 a 116726. Los oligonucleótidos AB y CD para ATG4 amplifican desde 4897516 hasta 4899822, para ATG17 desde 1226717 a 1229309 y en el caso de URA4 se amplificó desde la posición 115093 a 117311. El análisis de la secuencia en BLAST con el oligonucleótido ATG4 AB-AS mostró coincidencia con la región indicada en el cromosoma y no con ATG4, ya que la secuencia correspondiente al promotor proximal no está reportada como parte del gen y coincidentemente, esta

secuencia corresponde a regiones conservadas en el genoma como secuencias retrotransponibles. De la misma forma, el promotor proximal de *URA4* no está reportado como parte del gen, por lo que no muestra coincidencias con el gen, pero si con el genoma en la región amplificada, al hacer el análisis con BLAST en el oligonucleótido *ATG4* CD-S se muestran coincidencias tanto con el gen *ATG4* como *URA4* y *TAM14* el cual es un gen adyacente a *URA4* y se encuentra dentro de la región que se amplificó; por lo que se puede concluir que el cassette Δ *ATG4* se construyó de la forma propuesta en la **figura 19**. Con respecto a la secuenciación del plásmido con la construcción interruptora BA-*URA*-DC de *ATG17* (**ANEXO 3.1**), la reacción con el oligonucleótido *ATG17* AB-AS muestra coincidencias con el gen *MAM4* el cual se encuentra dentro de la región promotora proximal del gen *ATG17* y coincidencias con el cromosoma III en la región correspondiente al promotor proximal del gen *URA4*. La reacción con el oligonucleótido *ATG17* CD-S, mostró coincidencias con un gen que se traslapa con el gen *ATG17*, con el gen *URA4* y *TAM14* correspondientes a la región amplificada para la construcción del cassette, por lo que se puede concluir que se tiene el cassette Δ *ATG17* como se planteó previamente.

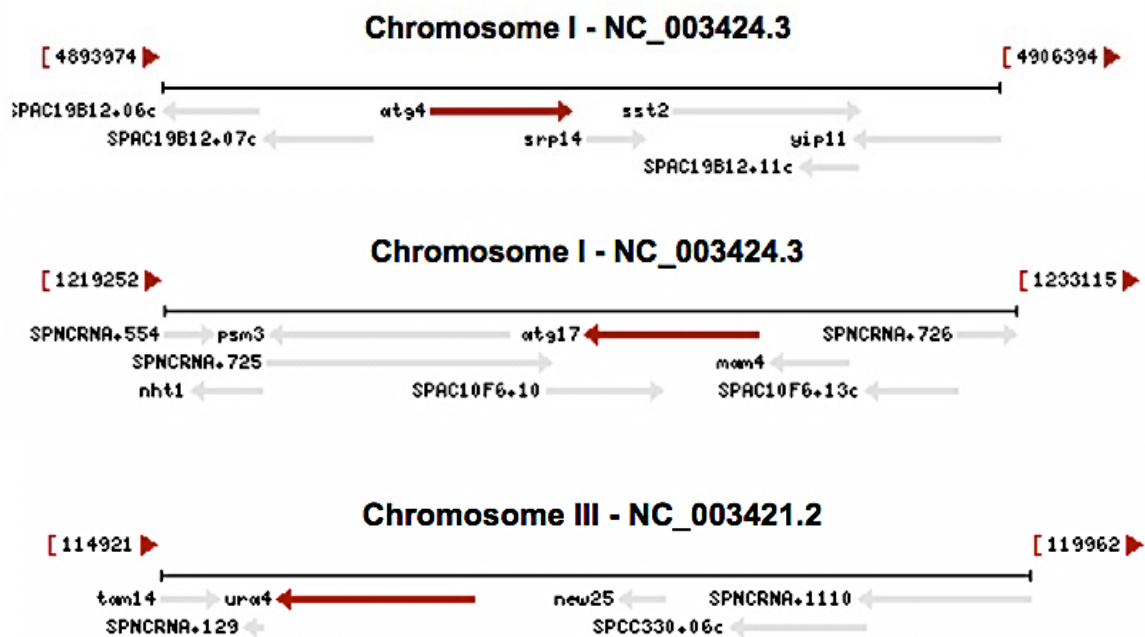


Figura 30. Contexto genómico de los genes *ATG4*, *ATG17* y *URA4* de *S. pombe*. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)

De acuerdo con la metodología descrita para el reemplazo génico de un solo paso es necesaria la linearización por restricción enzimática del vector, flanqueando los extremos 5' y 3' homólogos, los cuales son aptos para recombinarse y direccionar la integración en el locus del gen endógeno, lo cual resultaría en la integración del gen *URA4* (Rothstein, R.J. 1983). Por lo que en este trabajo se linearizaron los vectores utilizando la enzima *Xba*I (**Figura 31**) donde se puede observar que en caso de que no se diera la linearización por fenómenos de superenrollamiento el plásmido se observa en un peso superior y en caso de que se lleve a cabo la restricción enzimática, los plásmidos se observan en su peso (6030 pb Δ ATG4 y 6007 pb Δ ATG17), se cortó la banda correspondiente, se purificó y se utilizó para la transformación de la levadura *S. pombe* 3D. De acuerdo con el genotipo de las cepas auxotróficas para la transformación, éstas tienen deletado el fragmento de 1.8 kb correspondiente al gen *URA4*, por lo que en caso de que haya insertado el cassette de interrupción, la amplificación tanto del gen *URA4* (1764 pb) como del cassette sería positiva (3174 pb Δ ATG4 y 3168 pb Δ ATG17). El resultado fue la obtención de colonias positivas tanto para *ATG4* como *ATG17* (**Figura 32**), las cuales se corroboraron por PCR en colonia.

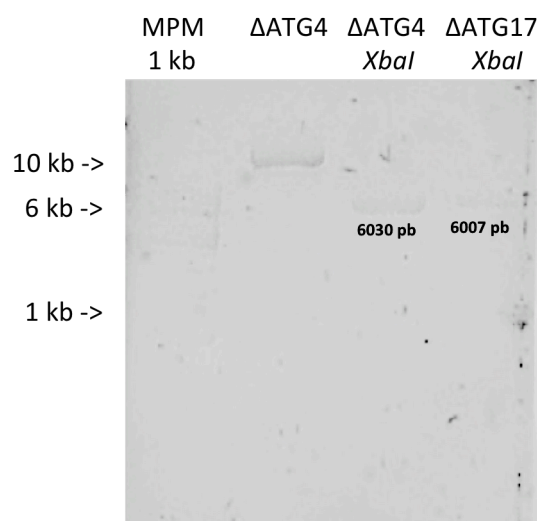


Figura 31. Linearización de los plásmidos pJET- Δ ATG4 y pJET- Δ ATG17. En el segundo carril se muestra al plásmido pJET- Δ ATG4 sin linealizar, en el tercer carril se muestra al plásmido pJET- Δ ATG4 linealizado con *Xba*I y en el cuarto carril al plásmido pJET- Δ ATG17.

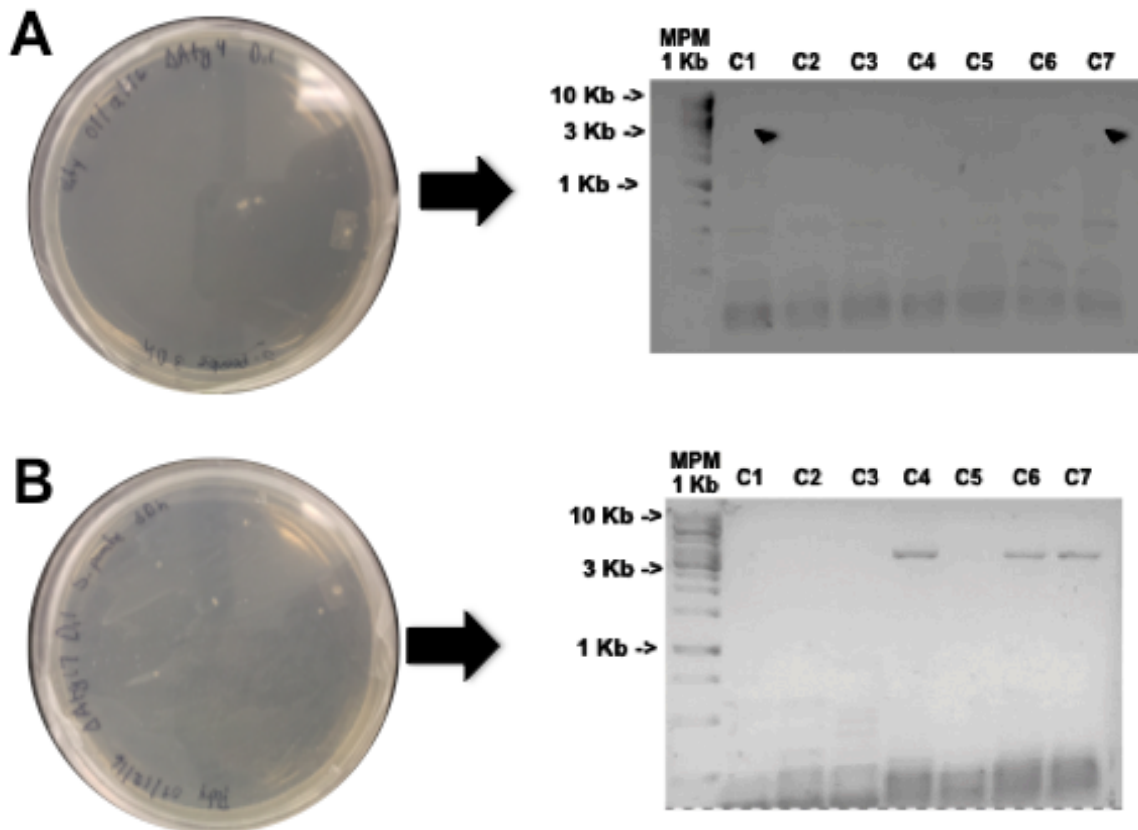


Figura 32. Comprobación por PCR en colonia de las transformantes *S. pombe* 3D Δ Atg4 y Δ Atg17. En el lado izquierdo se muestran las placas con las colonias resultantes de la transformación. A) Para la identificación de las colonias transformantes Δ Atg4 se utilizaron los oligonucleótidos ATG4 AB-AS y ATG4 CD-S correspondientes a la construcción completa del cassette interruptor observando a las colonias 1 y 7 positivas. B) Para la identificación de las colonias transformantes Δ Atg17 se utilizaron los oligonucleótidos ATG17 AB-AS y ATG17 CD-S correspondientes a la construcción completa del cassette interruptor observando a las colonias 4, 6 y 7 positivas.

Posterior a ésta transformación, se hizo una segunda verificación de las colonias por PCR en colonia utilizando oligonucleótidos que amplifican el marco de lectura abierto del gen *URA4*, el cual amplifica si la cepa tiene el gen *URA4* en su genoma, lo cual sería resultado de que se insertó el gen ya que la cepa *S. pombe* 3D tiene eliminado el fragmento de 1.8 kb del gen *URA4* (**Figura 33**), donde se pudo observar que había amplificación del gen *URA4* en cada una de las colonias seleccionadas.

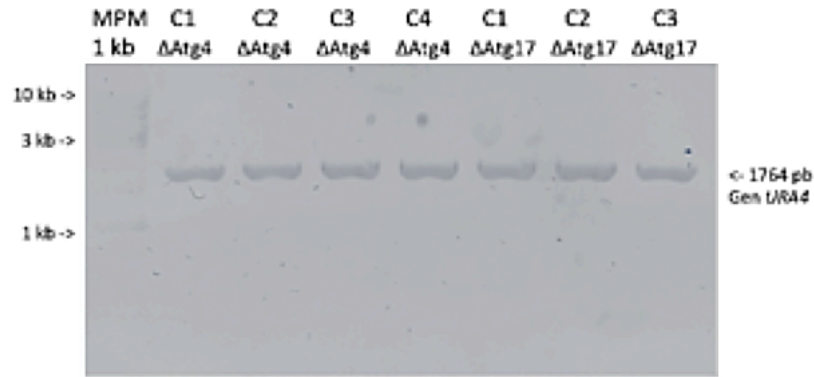


Figura 33. Comprobación por PCR en colonia de las transformantes de *S. pombe* 3D Δ Atg4 y Δ Atg17. Identificación del ORF URA4 con oligonucleótidos específicos, producto de 1764 pb. Se pueden observar que las colonias del 1 al 4 de Δ Atg4 y las colonias del 1 al 3 de Δ Atg17, mostraron amplificación del gen URA4.

Como parte de la comprobación del reemplazo génico se seleccionó al azar una colonia para Δ Atg4 y una para Δ Atg17 se cultivaron, se purificó su ADN cromosómico y a partir de éste se hizo PCR. Se utilizaron dos combinaciones de oligonucleótidos, la primera con ATG4/17 AB-AS y ATG4/17 CD-S (carriles 2 y 5 de la **figura 34**) y la segunda con ATG4/17 AB-S y ATG4/17 CD-AS (carriles 3 y 6 de la **figura 34**) los cuales amplificarían la construcción completa del cassette interruptor en caso de haberse insertado en otro lugar en el genoma, además se incluyó un control adicional con oligonucleótidos específicos para la secuencia codificante de los genes ATG4 y ATG17, el cual no debe amplificar en caso de que el reemplazo génico sea positivo; sin embargo, esta última PCR generó un amplicón como se puede observar en los carriles 4 y 7 de la **figura 34**, lo cual indica que el reemplazo génico no fue exitoso y existe la posibilidad de que el cassette pudo insertarse en otro lugar en el genoma.

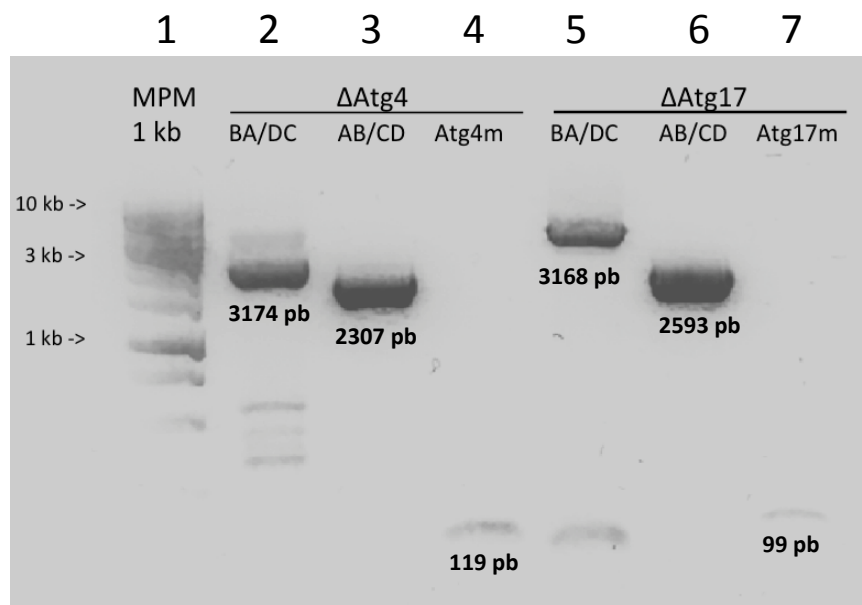


Figura 34. Comprobación por PCR de las transformantes *S. pombe* 3D Δ Atg4 y Δ Atg17. Se muestra la comprobación de la interrupción génica por PCR de la colonia transformante *S. pombe* 3D Δ Atg4, en el carril 2 se utilizaron los oligonucleótidos ATG4 AB-AS y ATG4 CD-S y en el carril 3 ATG4 AB-S y ATG4 CD-AS correspondientes a la construcción completa del cassette de reemplazo génico y en el carril 4 oligonucleótidos específicos para ATG4. Se muestra además la comprobación de la interrupción génica de Atg17, en el carril 5 se utilizaron los oligonucleótidos ATG17 AB-AS y ATG17 CD-S y en el carril 6 ATG17 AB-S y ATG17 CD-AS correspondientes a la construcción completa del cassette de reemplazo génico y en el carril 7 oligonucleótidos específicos para CDS de ATG17.

Teniendo en cuenta que el resultado más posible sería el inserto con la organización AB-URA4-CD, se decidió purificar de la banda y mandar a secuenciar el amplicón resultante de esta PCR (**Anexo 3.2**), el resultado esperado era una coincidencia tanto para los genes de interés así como para el gen URA4 como en caso de la secuenciación del plásmido con la secuencia de interrupción. Sin embargo, una vez obtenidos los resultados de la secuenciación se observó que solo hay coincidencias para el gen de interés y no para URA4 (**Anexo 3.2**), por lo que es claro que no se dio la interrupción.

Posterior a la secuenciación se repitió la transformación utilizando diferentes cepas mutantes de *S. pombe* la cuales tienen auxotrofia para uracilo (**Tabla 17**), en aquellas placas en las que se observó crecimiento se realizó la PCR en colonia; sin embargo, en este caso se utilizaron oligonucleótidos que amplifican parte de la secuencia codificante del gen de interés por lo que se esperó que resultaran negativas. No obstante, se observó un amplicón en cada

una de ellas, por lo que se concluye que a pesar de que hay crecimiento en el medio sin uracilo no hay reemplazo génico (**Figura 35**).

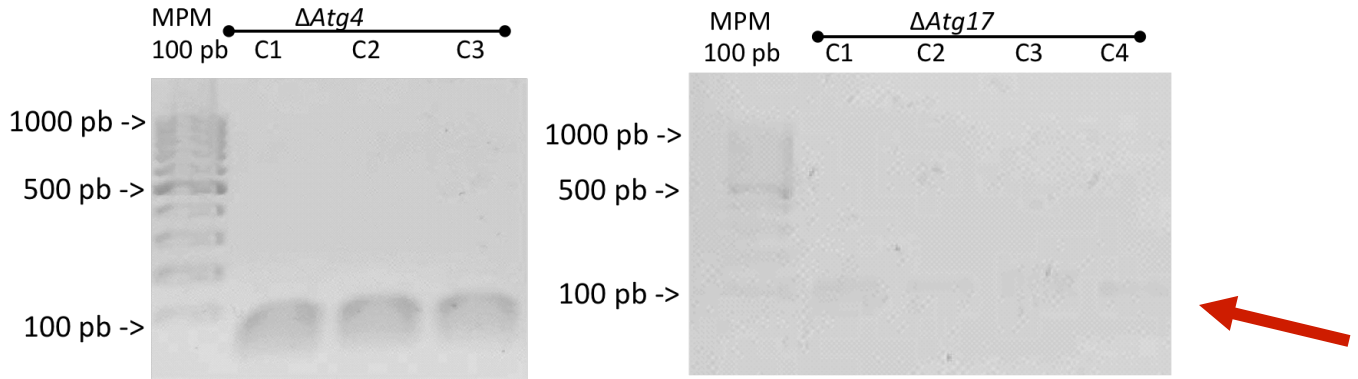


Figura 35. PCR en colonia de las colonias transformantes de *S. pombe* 3D Δ ATG4 y Δ ATG17. En el lado izquierdo se observan los amplicones correspondientes a parte del gen *ATG4* de 119 pb y en el lado derecho los amplicones correspondientes a un fragmento del gen *ATG17* de 99 pb.

Finalmente, para confirmar en forma definitiva la interrupción de los genes en estudio, se realizó una PCR flanqueando las regiones AB y CD en las colonias presuntas positivas a la interrupción del gen *ATG4* o *ATG17*, para lo cual fue necesario realizar la purificación de ADN cromosómico. En caso de la inserción correcta del cassette de interrupción, el amplicón debe corresponder a un peso de 3178 pb para *ATG4* y 3166 pb para *ATG17*. En caso de que no existiera la interrupción, los amplicones corresponderían a un peso de 2518 pb y 2764 pb respectivamente. Para la cepa diploide *S. pombe* 826 sería posible observar ambas bandas si se interrumpió un alelo; sin embargo, de acuerdo, sólo se observaron los amplicones correspondientes al peso aproximado de 2518 pb y 2764 pb (**Figura 36**), lo cual indica que no se tuvo éxito en la transformación de *S. pombe*, a pesar de que el cassette de interrupción cuenta con las características necesarias para insertarse en el cromosoma las cuales incluyen que las regiones flanqueantes sean de >250 pb, las cuales producen una alta eficiencia en la mutagénesis y una eficiencia en la integración de hasta el 100% (Wendland, J., 2003).

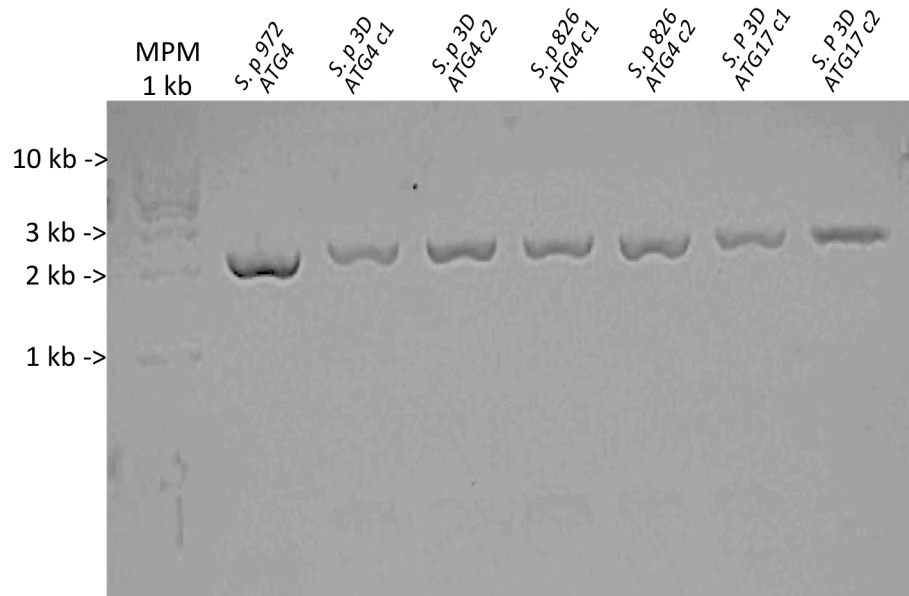


Figura 36. PCR de las colonias transformantes de *S. pombe* Δ ATG4 y Δ ATG17. Se utilizó como control de amplificación la cepa *S. pombe* 972, la cual debe mostrar la amplificación del gen sin interrupción de ATG4 correspondiente al peso de 2518 pb, se observa amplificación en el mismo peso tanto en las colonias transformadas con el cassette Δ ATG4 de *S. pombe* 3D y *S. pombe* 826. Se observa de la misma manera amplificación en el peso aproximado de 2765 pb en el caso de las colonias transformadas con el cassette Δ ATG17.

Debido a que no se tuvo éxito en la transformación se decidió hacer PCR en colonia a cada una de las cepas ocupadas las cuales son: la cepa diploide *S. pombe* 826 y tres haploides *S. pombe* 3D, *S. pombe* 4X y *S. pombe* Leu 1-32, en cuyo genotipo se reporta un Δ URA4D18 con auxotrofia a uracilo a excepción de *S. pombe* Leu 1-32 que sólo tiene reportada la mutación en gen LEU. En principio, se buscó que en ninguna de éstas se amplificara el gen URA4, excepto en la cepa *S. pombe* Leu 1-32. El resultado fue la amplificación del gen URA4 en las tres cepas haploides (**Figura 37**). Posterior a esto se mandaron a secuenciar los amplicones para ver si éstos correspondían al gen URA. El análisis de la secuencia determinó que en cada una de las cepas existe el gen URA con un 99% de similitud (**Anexo 3.3**); con lo que se corrobora que no existe la interrupción del gen URA4. Según la descripción del fenotipo de las mutantes éstas son D18, lo cual indica que se deletó el fragmento de 1.8 kb por restricción enzimática (Grimm, C., 1988), este resultado sugiere que éstas cepas pudieron ser transformadas con anterioridad, lo que imposibilita su transformación, ya que la probabilidad de que lleve a cabo la

hibridación con el gen de interés es más pequeña teniendo en cuenta que la cepa contiene el gen de selección en el cassette de reemplazo génico, y puede hibridar con el genoma de la levadura con mayor probabilidad que los fragmentos de los genes de interés mucho más pequeños, además de que en éste caso, el método de selección no es el indicado, ya que si éstas cepas tienen en su genoma el gen *URA4* éstas son capaces crecer en el medio sin uracilo, el cual es nuestro marcador de selección. La generación de mutantes *Atg4* y *Atg177* por reemplazo génico tendrá que abordarse en posteriores trabajos.

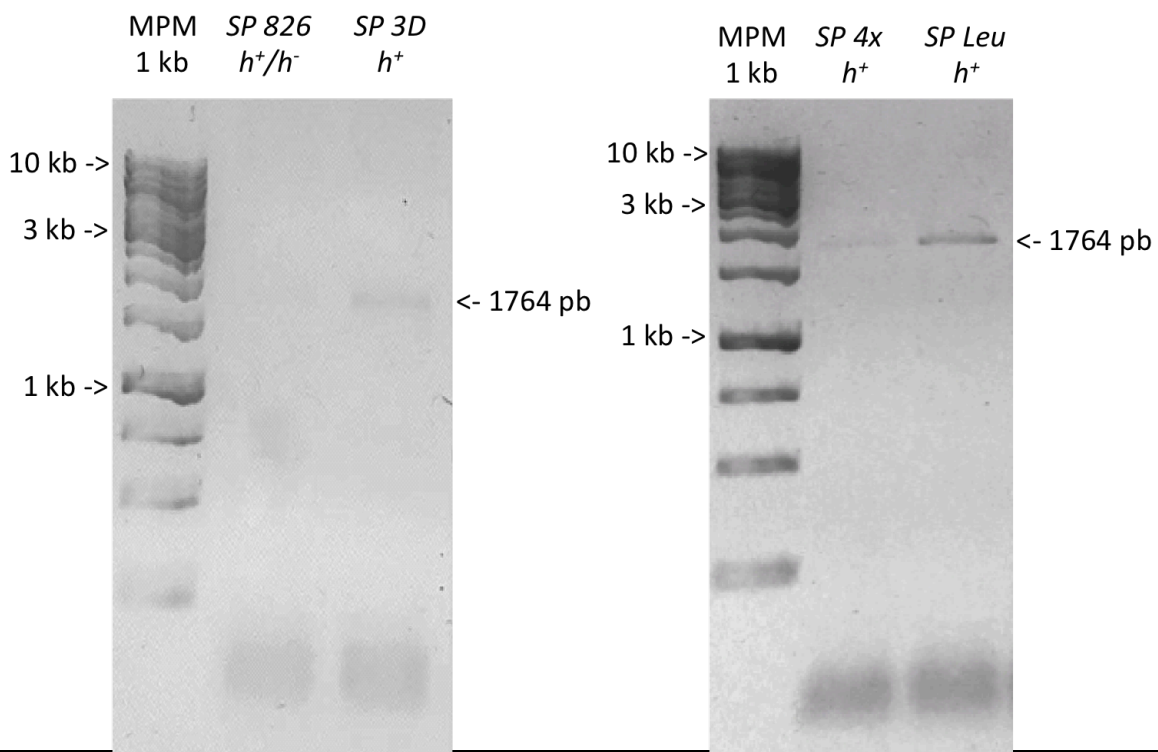


Figura 37. PCR en colonia de cepas de *S. pombe*. Amplificación del gen *URA4* en diferentes cepas mutantes *URA D18* de *S. pombe*, teniendo positivas 3 cepas haploides. Se muestra amplificación en las cepas de *S. pombe* 3*d*, 4*x* y *Leu* (haploides)

Con los resultados expuestos anteriormente, indicativos de que no se logró hacer la interrupción génica, se propone que es posible que la orientación de los fragmentos AB y CD homólogos a los genes *ATG4* y *ATG17* en la construcción de los cassette de interrupción no es la adecuada, ya que de acuerdo con los reportes, la construcción debió tener una orientación AB-*URA4*-CD y en el presente trabajo se planteó de manera BA-*URA4*-DC, lo que haría que el cassette entrara en posición contraria y dificultaría el posicionamiento correcto del cassette.

10. CONCLUSIONES

En *S. pombe* sometida a envejecimiento cronológico, el nivel de expresión del ARNm de los genes de autofagia se expresa de la siguiente manera:

- En condiciones de crecimiento en medio mínimo EMM, hay una disminución significativa de los niveles de ARNm de los genes ATG4 y ATG17 a partir del día 6, característico del envejecimiento cronológico donde se ha propuesto que hay disminución de la autofagia.
- En condiciones de crecimiento en medio rico YE, existe un aumento significativo en los niveles de ARNm de los genes ATG4, ATG17 y ATG18a, a partir del día 6 de cultivo, como respuesta a las condiciones nutrimentales y al aumento de estrés en células envejecidas.

Se realizó la construcción de los genes para el reemplazo génico en la orientación BA-URA4-DC para ATG4 y ATG17

- No se logró el reemplazo de los genes ATG4 y ATG17 en las cepas de *S. pombe* 3D, 4X y 826.

11. PERSPECTIVAS

- Medir por Western blot los niveles de proteína de los genes *ATG4* y *ATG17*.
- Hacer un replanteamiento sobre las construcciones de interrupción para el reemplazo génico, donde tengan la orientación AB-URA4-CD.
- Realizar el reemplazo génico y complementación de los genes *ATG4* y *ATG17* de *S. pombe* y hacer su caracterización en condiciones de envejecimiento cronológico.
- Generar la construcción para el reemplazo génico del gen *ATG18a* y caracterizar el efecto sobre el envejecimiento cronológico.
- Medir la actividad de la proteína *ATG4* con la construcción *ATG8-GFP*, por microscopía de fluorescencia y Western blot en condiciones de envejecimiento cronológico y en las mutantes a las que se les haya hecho el reemplazo génico.
- Hacer un microarreglo a las cepas a las que se les haga la delección para caracterizar las vías que se ven afectadas en ausencia de éstos genes y ver la respuesta en condiciones de envejecimiento cronológico.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, C.; Buttner, S.; Aragon, A. D.; Thomas, J. A.; Meirelles, O.; Jaetao, J. E.; Benn, D.; Ruby, S. W.; Veenhuis, M.; Madeo, F.; Werner-Washburne, M. Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J Cell Biol* **2006**, 174: 89–100.
- Bartke A. Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinol* **2005**, 146(9):3718-23.
- Bergamini, E.; Cavallini, G.; Donati, A.; Gori, Z. The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci* **2007** 10: 1114:69-78.
- Breitenbach, M.; Jazwinski, M.; Laun, P. Aging research in yeast, *Subcellular Biochemistry, Springer Netherlands* **2012**, 57: 1-57
- Campisi, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol* **2013**75: 685–705.
- Carmona, D.; Büttner, S. The many ways to age for a single yeast cell. *Yeast* **2014** 31(8): 289–298.
- Chen, Y.; Yu, L. Recent progress in autophagic lysosome reformation. *Traffic* **2017**, 18: 358–361.
- Cheong, H.; Yorimitsu, T.; Reggiori, F.; Legakis, J. E.; Wang, C. W.; Klionsky, D. J. Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. *Mol Biol Cell* **2005**, 16(7): 3438–3453.
- Clancy, D. J.; Gems, D.; Harshman, L. G.; Oldham, S.; Stocker, H. Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science* **2001**, 292: 104–106.
- CONAPO. Documento metodológico Proyecciones de la población de México 2010-2050, CONAPO, México **2012**.
- Fabrizio, P.; Longo, V. D. (2008) Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1783: 1280–1285
- Fabrizio, P.; Pozza, F.; Pletcher, S. D.; Gendron, C. M.; Longo, V. D. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **2001**, 292: 288–290
- Feng, Y.; He, D.; Yao, Z.; Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell Research* **2014**, 24(1): 24-41.
- Feng, Y.; Yao, Z.; Klionsky, D. J. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* **2015**, 25(6): 354-363.
- Fernández, Á. F.; López-Otín, C. The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *J Clin Invest* **2015**, 125(1): 33-41.
- Filomeni, G.; De Zio, D.; Cecconi, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage

and metabolic needs. *Cell Death Differ* **2015**, 22(3): 377-388.

Fujioka, Y.; Noda, N. N.; Nakatogawa, H.; Ohsumi, Y.; Inagaki, F. Dimeric Coiled-coil Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and Its Functional Significance in Autophagy. *J Biol Chem* **2010**, 285(2): 1508–1515.

Garay, E.; Campos, S. E.; González de la Cruz, J.; Gaspar, A. P.; Jinich, A.; De Luna, A. (2014). High-Resolution Profiling of Stationary-Phase Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions. *PLoS Genet* **2014**, 10(2): e1004168.

Green, M. R.; Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cuarta edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2012**, Vol 1-3.

Grimm, C.; Kohli, J.; Murray, J.; Maundrell, K. Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol Gen Genet* **1988**, 215(1): 81-86.

Hlavata, L.; Nachin, L.; Jezek, P.; Nystrom, T. Elevated Ras/protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* reduces proliferation rate and lifespan by two different reactive oxygen species-dependent routes. *Aging Cell* **2008**, 7: 148–157.

Huang, J.; Klionsky, D. J. Autophagy and human disease. *Cell Cycle* **2007**, 6: 1837–1849.

Ichimura, Y.; Kirisako, T.; Takao, T.; Satomi, Y.; Shimonishi, Y.; Ishihara, N.; Mizushima, N.; Tanida, I.; Kominami, E.; Ohsumi, M.; Noda, T.; Ohsumi, Y. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **2000**, 408: 488–492.

Itakura, E.; Mizushima, N. (2010) Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **2010**, 6: 764–776

Jin, M.; Klionsky, D. J. The core molecular machinery of autophagosome formation. *Autophagy Cancer* **2013**, 8: 25–45

Kabeya, Y.; Kamada, Y.; Baba, M.; Takikawa, H.; Sasaki, M.; Ohsumi, Y. Atg17 Functions in Cooperation with Atg1 and Atg13 in Yeast Autophagy. *Mol Biol Cell* **2005**, 16(5): 2544–2553.

Kawamata, T.; Kamada, Y.; Kabeya, Y.; Sekito, T.; Ohsumi, Y. Organization of the Pre-autophagosomal Structure Responsible for Autophagosome Formation. *Mol Biol Cell* **2008**, 19(5): 2039-2050.

Keeney JB, Boeke JD. Efficient Targeted Integration at *Leu1-32* and *Ura4-294* in *Schizosaccharomyces Pombe*. *Genetics* **1994**, 136(3): 849-856.

Klionsky, D. J.; Cregg, J. M.; Dunn, W. A.; Emr, S. D.; Sakai, Y.; Sandoval, I. V.; Sibirny, A.; Subramani, S.; Thumm, M.; Veenhuis, M.; Ohsumi, Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **2003**, 5: 539–545.

- Klionsky, D. J.; Emr, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **2000**, 290: 1717–1721.
- Krawchuk, M. D.; Wahls, W. P. High-efficiency Gene Targeting in *Schizosaccharomyces pombe* Using a Modular, PCR-based Approach with Long Tracts of Flanking Homology. *Yeast* **1999**, 15(13): 1419-1427.
- Lancho, D. Determinación de la secuencia de los genes fma1, fma2 e icp55, análisis in silico de la estructura de las proteínas y evaluación del nivel de ARNm en el envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, Diciembre **2015**.
- Lapierre, L. R.; Kumsta, C.; Sandri, M.; Ballabio, A.; Hansen, M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy* **2015**, 11(6): 867–880.
- Lin, S. J.; Austriaco, N. Aging and Cell Death in the Other Yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **2014**, 14(1):119-135.
- Longo, V. D.; Fabrizio, P. Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sub-Cellular Biochem* **2012**, 57: 101–121
- Longo, V. D.; Finch, C. E. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthycentenarians. *Science* **2003**, 299:1342–1346
- López, O.; Blasco, M. A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. (2013). The Halmarks of aging. *Cell* **2010**, 153: 1194-1217.
- Lynch, M. A.; Klionsky, D. J. The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett* **2010**, 584(7): 1359–1366.
- Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* **2007**, 21: 2861–2873.
- Monastyrska, I.; Rieter, E.; Klionsky, D. J.; Reggiori, F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc* **2009**. 84(3): 431–448.
- Moreau, K.; Ravikumar, B.; Renna, M.; Puri, C.; Rubinsztein, D. C. Autophagosome Precursor Maturation Requires Homotypic Fusion. *Cell* **2011**, 146(2): 303–317.
- Morselli, E.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Criollo, A.; Maiuri, M. C.; Tavernarakis, N.; Madeo, F.; Kroemer, G. Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging* **2009**, 1(12): 961–970.
- Mukaiyama, H.; Nakase, M.; Nakamura, T.; Kakinuma, Y.; Takegawa, K. Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **2010**, 584(7): 1327-34.
- Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kanamada, Y.; Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Mol Cell Biol* **2009**, 10: 458-467.

- Nice, D. C.; Sato, T. K.; Stromhaug, P. E.; Emr, S. D.; Klionsky, D. J. Cooperative Binding of the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway Proteins, Cvt13 and Cvt20, to Phosphatidylinositol 3-Phosphate at the Pre-autophagosomal Structure Is Required for Selective Autophagy. *J Biol Chem* **2002**, 277(33): 30198–30207.
- Obara, K.; Ohsumi, Y. PtdIns 3-Kinase Orchestrates Autophagosome Formation in Yeast. *J Lipids* **2011**, 498768.
- Panowski, S. H.; Dillin A. Signals of youth: endocrine regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Endocrinol Metab* **2009**, 20(6): 259-64.
- Periyasamy, S.; Jiang, M.; Schoenlein, P.; Dong, Z. Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* **2009**, 297(2): F244–F256.
- Pietrocola, F.; Izzo, V.; Niso-Santano, M.; Vacchelli, E.; Galluzzi, L.; Maiuri, M. C.; Kroemer, G. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol* **2013**, 23: 310-22.
- Prasad, K. N. Intervention with multiple micronutrients including dietary and endogenous antioxidants for healthy aging. *Aging and Age-Related Disorders*, **2010**, 1: 55-78.
- Roux, A. E.; Chartrand, P.; Ferbeyre, G.; Rokeach, L. A. Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2010**, 5(1): 1-8.
- Roux, A. E.; Leroux, A.; Alaamery, M. A.; Hoffman, C. S.; Chartrand, P.; Ferbeyre, G.; Rokeach, L. A. Pro-Aging Effects of Glucose Signaling through a G Protein-Coupled Glucose Receptor in Fission Yeast. *PLoS Genet* **2009** 5(3): e1000408
- Roux, A. E.; Quissac, A.; Chartrand, P.; Ferbeyre, G.; Rokeach, L. A. Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* **2006**, 5(4): 345-357.
- Segundo, P. L. Evaluación de la expresión del ARNm de genes de autofagia en el modelo de envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, Mayo **2015**.
- Settembre, C.; Di Malta, C.; Polito, V. A.; Garcia-Arencibia, M.; Vetrini, F.; Erdin, S.; Erdin, S. U.; Huynh, T.; Medina, D.; Colella, P. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **2011**, 332: 1429-33.
- Shintani, T.; Huang, W. P.; Stromhaug, P. E.; Klionsky, D. J. Mechanism of Cargo Selection in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Developmental Cell* **2002**, 3(6): 825–837.
- Sipiczki, M. Fission yeast phylogenesis and evolution. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer **2004**, 431–443.

- Spong, A.; Bartke, A. Hormonal influences on aging and lifespan. The comparative biology of Aging. *Springer*, **2010**, 1: 43-68.
- Sun, L. L.; Li, M.; Suo, F. Global Analysis of Fission Yeast Mating Genes Reveals New Autophagy Factors. *Heitman J, ed. PLoS Genetics*. **2013**, 9(8): e1003715.
- Suzuki, N. N.; Yoshimoto, K.; Fujioka, Y.; Ohsumi, Y.; Inagaki, F. The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* **2005**, 1(2):119–126
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genom Biol*, **2002**, 3(7): research0034.1-research0034.11.
- Vanhaesebroeck, B.; Guillermet, J.; Graupera, M.; Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, 11(5): 329–41.
- Wach A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **1996**, 12(3): 259-65.
- Wang, L.; Kao, R.; Ivey, F. D.; Hoffman, C. S. Strategies for gene disruptions and plasmid constructions in fission yeast. *Methods* **2004**, 33(3): 199-205.
- Wendland, J. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. *Curr Genet* **2003** 44(3): 115-23.
- Wei, M.; Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., & Longo, V. D. Life Span Extension by Calorie Restriction Depends on Rim15 and Transcription Factors Downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics* **2008**, 4(1): e13.
- Wesselborg, S.; Stork, B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2015**, 72: 4721-4757.
- Xie, Y.; Kang, R.; Sun, X.; Zhong, M.; Huang, J.; Klionsky, D. J.; Tang, D. Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy. *Autophagy* **2015**, 11(1): 28–45.
- Xie, Z.; Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **2007**, 9: 1102–1109.
- Yen, W. L.; Klionsky, D. J. How to Live long and prosper: Autophagy, Mitochondria, and Aging. *Physiology* **2008**, 23: 248-262.
- Yu, Z. Q.; Ni, T.; Hong, B.; Wang, H. Y.; Jiang, F. J.; Zou, S.; Xie, Z. Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* **2012**, 8(6): 883–892.
- Zhao, J.; Brault, J. J.; Schild, A.; Cao, P.; Sandri, M.; Schiaffino, S.; Lecker, S. H.; Goldberg, A. L. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **2007**, 6: 472-83.

13. ANEXO: REACTIVOS

13.1. Medios de cultivo

Medio YE (Yeast Extract)

Reactivo	Concentración
Extracto de levadura	0.5 %
Dextrosa	3 % / 2 %

Medio EMM (Edinburgh minimal media)

Reactivo	Concentración
Ácido ftálico	3.3 g
Na ₂ PO ₄	2.24 g
NH ₄ Cl	5.5 g
Sales 50X	2 %
Glucosa	2 %

- Aminoácidos (sin son requeridos)
- Vitaminas 1X
- Minerales 1X

Complejo vitamínico 1000X

Reactivo	Concentración
Ácido pantoténico	0.1 %
Ácido nicotínico	1 %
Inositol	1 %
Biotina	0.1 %

Complejo de Minerales 10 000X

Reactivo	Concentración
Ácido bórico	0.5 %
MnSO ₄ H ₂ O	0.45 %
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.72 %
FeCl ₂ .4H ₂ O	0.17 %
Ácido molíbdico	0.16%
K	0.1 %
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.10 %
Ácido cítrico	1.1 %

Sales 50X

Reactivo	Concentración
MgCl ₂ 6 H ₂ O	0.00535 %
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.075 %
KCl	5 %
Na ₂ SO ₄	0.2%

Medio LB (Luria Bertani)

Reactivo	Concentración
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl ₂	0.5 %
Triptona	3%

Medio YNB (Yeast Nitrogen Base)

Reactivo	Concentración
YNB DIFCO	6.7 %
Acetato de Sodio	1 %
KCl	0.9 %
Glucosa	3 %

- Componentes auxotróficos
(Leucina 1X, Adenina 1X, Uracilo 1X, Timina 1X)

13.2 Reactivos para transformación y lisis

Solución de lisis para ADN

Reactivo	Concentración
Triton (X-100)	2 %
SDS	1 %
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	0.38 mM

Buffer de Zimolyasa

Reactivo	Concentración
Ácido cítrico pH 5.6	50 mM
Na ₂ HPO ₄ pH 5.6	50 mM
EDTA pH8	40 mM
Sorbitol	1.2 mM

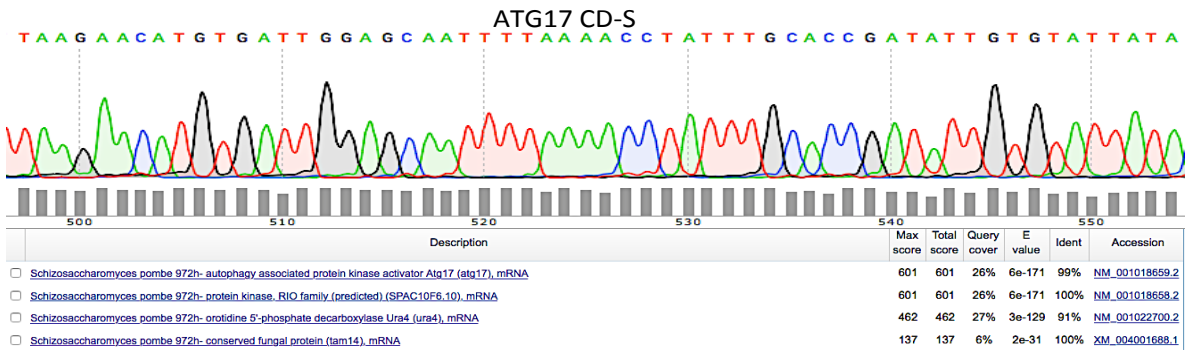
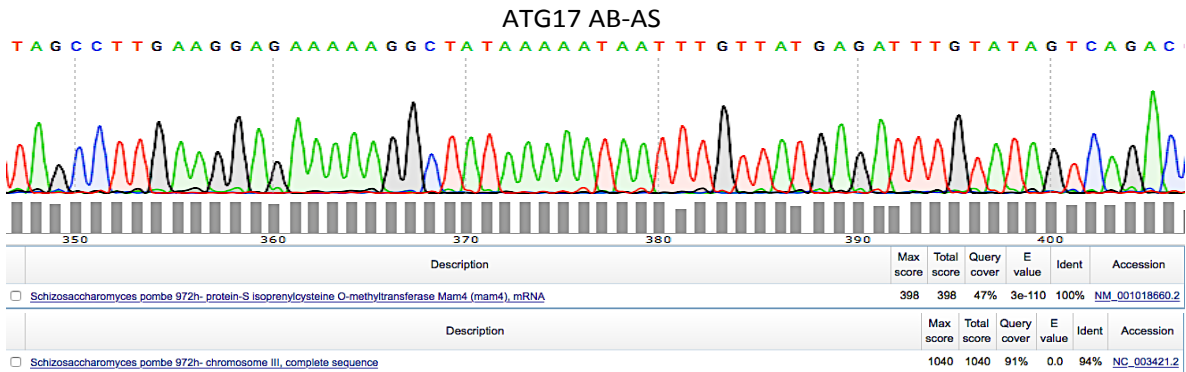
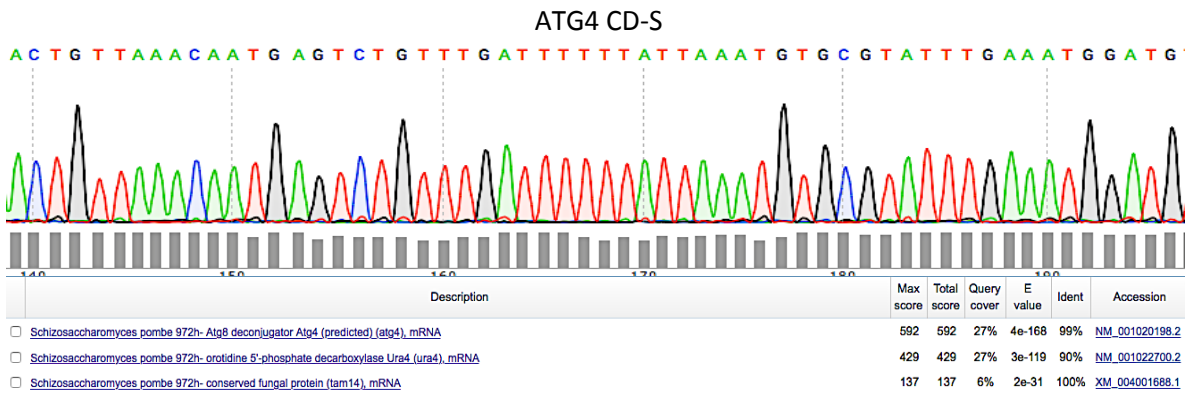
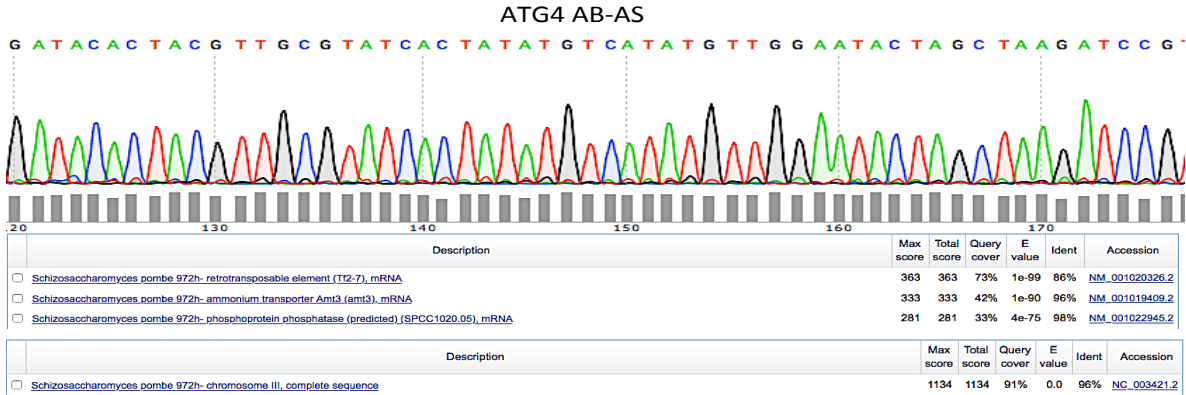
LiOAc/TE

Reactivo	Concentración
* LiOAc 10X	
Acetato de Litio pH 7.5	10 M
* TE 10X	
Tris/HCl pH 7.5	100 mM
EDTA pH 8	10 mM

40% PEG/LiOAc/TE

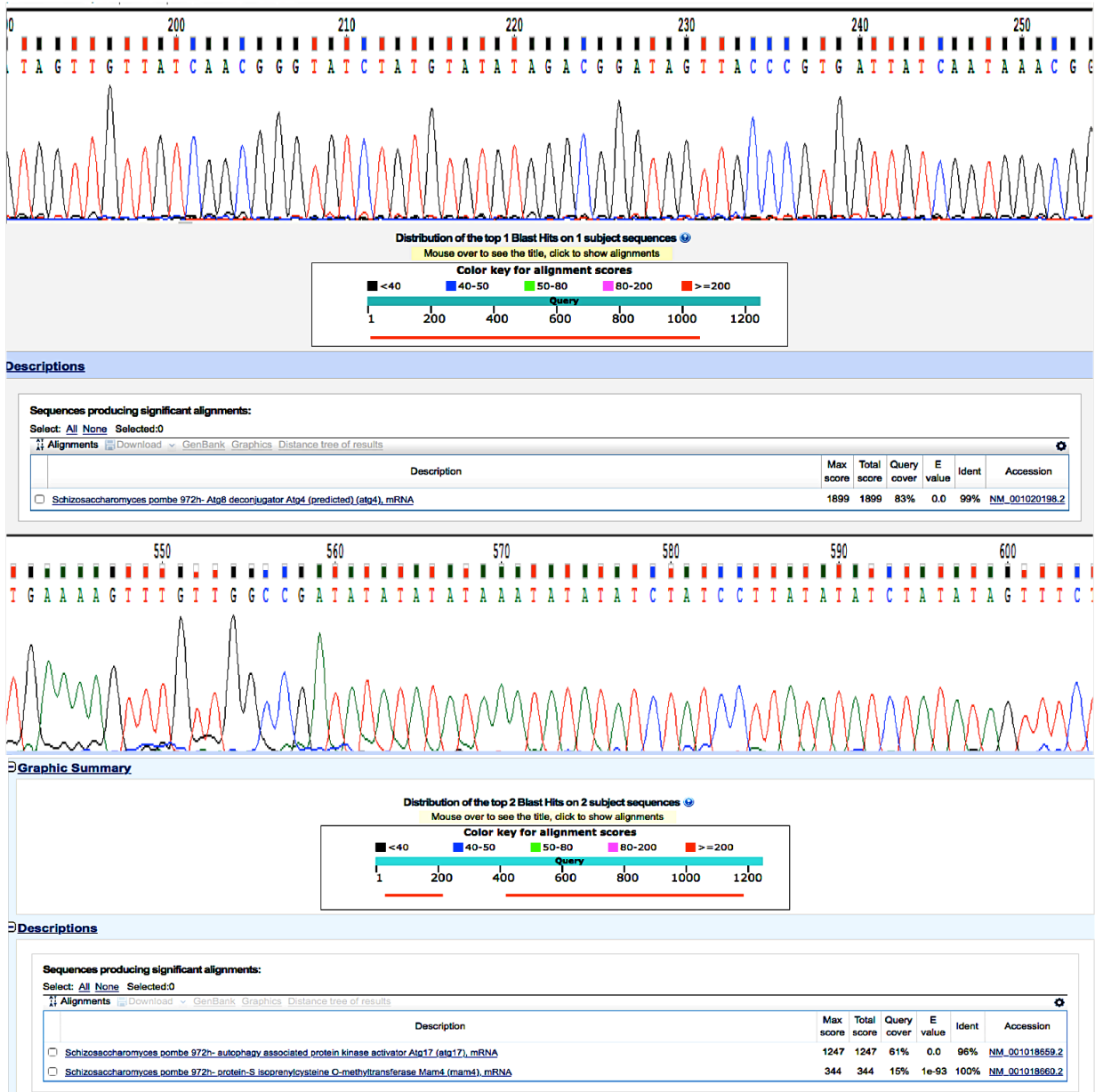
Reactivo	Concentración
LiOAc	1X
TE	1X
PEG	40 %

13.3 Electroferogramas

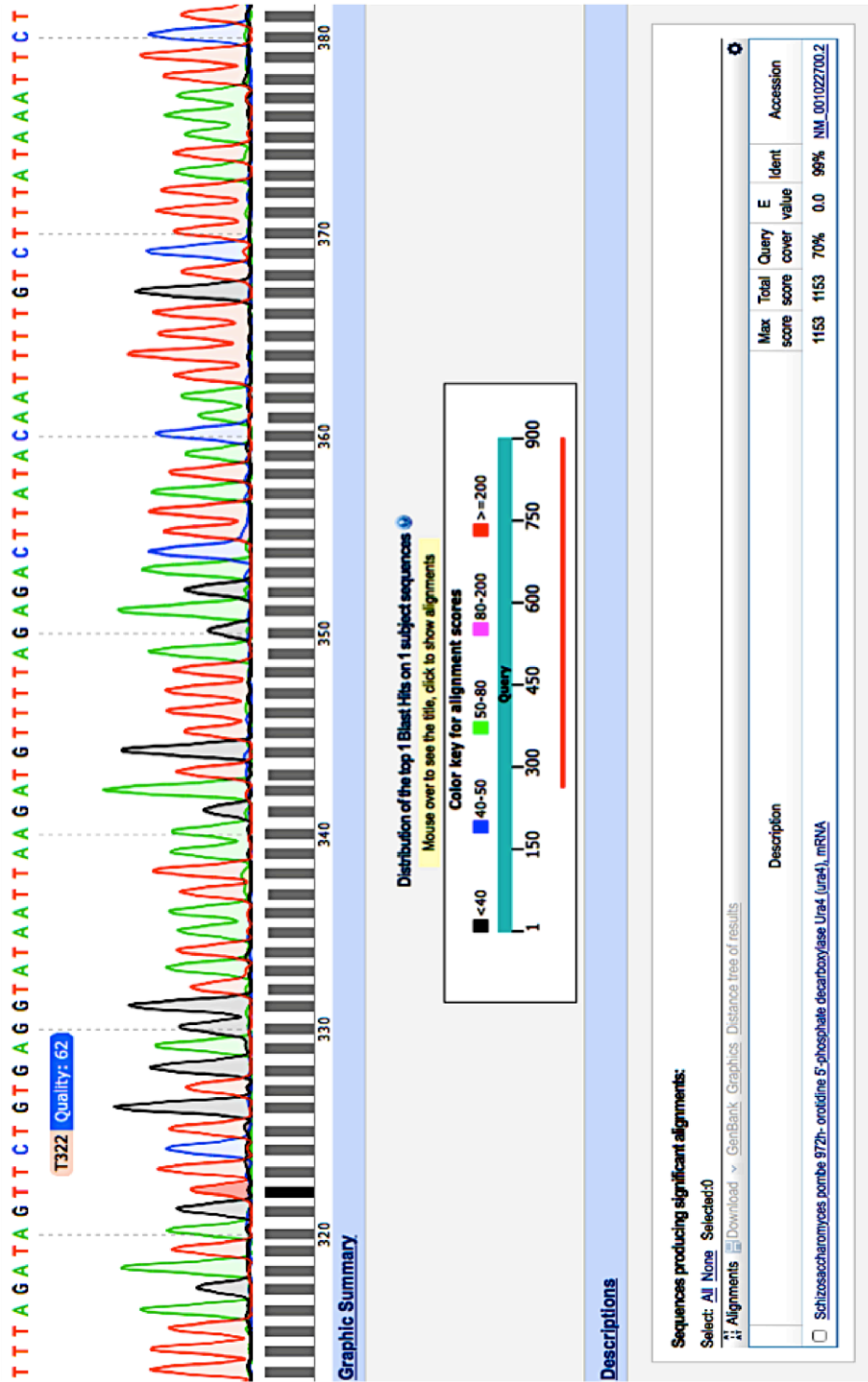


Anexo 3.1. Secuenciación de los plásmidos pJET-ΔATG4 y pJET-ΔATG17. La secuenciación se realizó por el método de Sanger automatizado en capilar, las secuencias arrojadas fueron analizadas con el programa BLAST. Se observan fracciones de los electroferogramas obtenidos

donde se observa que éstos son de buena calidad y el resultado del análisis con el programa BLAST muestra coincidencias con las regiones de interés (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Anexo 3.2. Secuenciación de los plásmidos AB-URA4-CD. La secuenciación se realizó por el método de Sanger automatizado en capilar, las secuencias arrojadas fueron analizadas con el programa BLAST. Se observan fracciones de los electroferogramas obtenidos donde se observa que éstos son de buena calidad y el resultado del análisis con el programa BLAST, muestra las coincidencias sólo con el gen de interés y no con el gen URA4 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Anexo 3.2. Resultados de la secuenciación del amplicón correspondiente al gen URA4. La secuenciación se realizó por el método de Sanger automatizado en capilar, las secuencias arrojadas fueron analizadas con el programa BLAST. Los resultados muestran un porcentaje de identidad del 99% con el gen URA4.